

UNTERSUCHUNG ALTERSBEDINGTER VERÄNDERUNGEN VON KOLLAGEN XVII

SONJA HUTTENLOCHER

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus der Klinik für Kleintiere
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Reto Neiger
und
der Klinik für Dermatologie und Allergologie
des Hautzentrums des Universitätsklinikums Gießen und Marburg
Standort Marburg
Betreuer: Prof. Dr. Michael Hertl

UNTERSUCHUNG ALTERSBEDINGTER VERÄNDERUNGEN VON KOLLAGEN XVII

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Sonja Huttenlocher

Tierärztin aus Leonberg

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Prof. Dr. Manfred Reinacher

Gutachter:

Prof. Dr. Reto Neiger

Prof. Dr. Michael Hertl

Tag der Disputation: 25.05.2007

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1.1 Blasenbildende Erkrankungen der Haut	1
1.1.1 Einteilung dieser Krankheiten	1
1.1.2 Das Bullöse Pemphigoid (BP)	1
1.1.2.1 Vorkommen bei Menschen	2
1.1.2.2 Ätiologie und Pathogenese	2
1.1.2.3 Klinik	2
1.1.2.4 Diagnose	3
1.1.2.5 Therapie	3
1.1.2.6 Veterinärmedizinische Relevanz des BP bei Haussäugetieren	3
1.2 Kollagen XVII	4
1.2.1 Die Entdeckung von Kollagen XVII	6
1.2.2 Vorkommen und Funktion	6
1.2.3 Struktur	6
1.2.4 Abspaltung der Ektodomäne von der Vollform des Kollagen XVII (Shedding)	7
1.2.5 Beide Formen von Kollagen XVII sind Autoantigene des BP	10
1.2.6 Das Gen von Kollagen XVII	11
1.3 Plasmin und seine Aktivatoren	11
1.3.1 Plasmin und die proteolytische Kaskade	11
1.3.2 Plasminogenaktivatoren (PA)	12
1.3.3 Der Nachweis von Plasminogenaktivatoren in dieser Arbeit	12
1.4 Ziel und Hintergrund dieser Arbeit	14
Materialien	15
2.1 Geräte	15
2.2 Verbrauchsmaterialien	15
2.3 Chemikalien	16
2.4 Häufig verwendete Lösungen	17
2.5 Marker	19
2.6 Antikörper	20
2.6.1 Primäre Antikörper gegen Kollagen XVII aus Kaninchen	20

2.6.2	Sekundärer Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen-AK	20
2.7	Molekularbiologische Kits	20
Methoden		21
3.1	Zellkultur	21
3.1.1	Kultivierung von humanen Hautzellen	21
3.1.2	Isolierung der Keratinozyten aus humanen Hautbiopsien	22
3.1.3	Passagieren der Zellen	23
3.1.4	Einfrieren von Keratinozyten	23
3.1.5	Auftauen von Keratinozyten	23
3.1.6	Ascorbat-Behandlung der Keratinozyten	24
3.2	Proteinanalyse	24
3.2.1	Herstellung von Proteinextrakten aus Keratinozyten	24
3.2.2	Proteingehaltsbestimmung	25
3.2.3	Methanolpräzipitation der Proteine	26
3.2.4	Diskontinuierliche SDS-PAGE zur Auftrennung der Proteine	26
3.2.5	Immunoblot der aufgetrennten Proteine	27
3.2.6	Proteinnachweis durch Immunodetektion	28
3.3	RNA-Analyse	30
3.3.1	Isolierung der mRNA aus einer Keratinozyten -Kultur	30
3.3.2	Photometrische Bestimmung der Konzentration der Nukleinsäuren	31
3.3.3	RT-PCR	31
3.3.4	Agarosegel -Elektrophorese zur Auftrennung der cDNA-Fragmente	34
3.4	Statistik	34
Ergebnisse		35
4.1	Immundetektion der Vollform von Kollagen XVII und seiner löslichen Ektodomäne	35
4.1.1	Nachweis der Vollform des Kollagen XVII als Maßstab der Expression	36
4.1.2	Immundetektion der freigesetzten löslichen Kollagen XVII -Ektodomäne	38
4.2.	Nachweis der mRNA-Expression	40
4.2.1	RT-PCR-Nachweis der Vollform des Kollagen XVII, seiner Protease TACE und deren Inhibitor TIMP-3	40
4.2.2	Nachweis der mRNA -Expression von den Plasminogenaktivatoren	42

Diskussion	45
5.1 Kollagen XVII -Expression im Alter	45
5.2 Vermehrtes Shedding von Kollagen VXII im Alter	45
5.3 Die Expression der Sheddase TACE und ihres Inhibitors TIMP-3 ist altersunabhängig	47
5.4 Die Expression der Plasminogenaktivatoren ist nur teilweise altersabhängig	48
5.5 Ausblick	50
 Zusammenfassung	 51
 Summary	 53
 Literatur	 55
 Abbildungsverzeichnis	 65
 Tabellenverzeichnis	 66
 Abkürzungsverzeichnis	 67
 Danksagung	 70
 Lebenslauf	 71

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Blasenbildende Erkrankungen der Haut

1.1.1 Einteilung dieser Krankheiten

Der Begriff „Blasenbildende Erkrankungen“ fasst chronisch verlaufende Hautkrankheiten verschiedener Genese zusammen, denen allen Blasen als Primäreffloreszenzen gemeinsam sind. Man unterscheidet dabei angeborene Gendermatosen und erworbene, immunologisch bedingte Dermatosen. Die letzteren Autoimmundermatosen teilt man selbst wieder in folgende drei Hauptgruppen auf (Fritsch 1998):

- a.) Dermatosen mit intradermaler Akantholyse (Pemphigusgruppe)
- b.) Dermatosen mit subepidermaler Blasenbildung (Pemphigoidgruppe)
- c.) Dermatosen mit sublaminärer, dermolytischer Spaltbildung
(z.B. Dermatitis herpetiformis)

1.1.2 Das Bullöse Pemphigoid (BP)

Das Bullöse Pemphigoid (BP) gehört der Pemphigoid-Gruppe an, einer heterogenen Gruppe, deren Mitgliedern allen subepidermale Spaltbildung gemeinsam ist (Effendy et al. 2005). Das BP stellt somit eine blasenbildende Autoimmundermatose besonders des älteren Menschen, selten von Kindern, dar (Schmidt et al. 2000). Es handelt sich um eine erworbene, schwere Hautkrankheit mit chronischem und zum Teil lebensbedrohlichem Verlauf (Rassner 1997). Beschrieben wurde die Krankheit erstmals im Jahre 1953 von Lever (Lever 1953). Knapp 15 Jahre später wurden von Jordon und seinen Mitarbeitern die zirkulierenden und gewebsgebundenen Antikörper des Bullösen Pemphigoids gefunden (Jordon et al. 1967), die 1993 den immunbedingten Autoantikörpern zugeordnet werden konnten (Liu et al. 1993).

1.1.2.1 Vorkommen bei Menschen

Das Bullöse Pemphigoid ist die mit Abstand häufigste blasenbildende Immundermatose des Menschen. Ihr Auftreten wird mit einer Inzidenz von etwa 6 / 1 Million Einwohner / Jahr beziffert (Bernard et al. 1995; Zillikens et al. 1995). Das BP tritt weltweit auf und zeigt keine ethnische Prädisposition (Fritsch 1998). Während die Häufigkeit des Auftretens im Alter < 60 Jahren bei 0,6 Fällen pro Million Einwohner und Jahr liegt, erkranken in der Altersklasse > 90 Jahren knapp 400 Personen pro Million Einwohner jedes Jahr neu (Jung et al. 1999).

1.1.2.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie ist vielfältig (Brenner et al. 2003). Das BP entsteht meist spontan. Jedoch sind als Auslöser Arzneimittel, besonders Neuroleptika, und UV-Licht beobachtet worden. Tumoren, aber auch eine genetische Prädisposition, wurden beschrieben (Delgado et al. 1996). Die Blasenbildung ist Folge der Freisetzung von hochaffinen Autoantikörpern gegen zwei Strukturproteine der Hemidesmosomen. Im Jahr 1981 wurde das Bullöse Pemphigoid-Antigen 1, BPAG-1, identifiziert (Stanley et al. 1981). Es ist auch als BP230 bekannt, da es ein 230 kDa schweres Protein der Plakin-Familie darstellt. Wenige Jahre später wurde das zweite Strukturantigen BPAG-2, das auch als BP180 oder Kollagen XVII bezeichnet wird, beschrieben (Labib et al. 1986). Die dagegen gerichteten Antikörper binden im Bereich der Junktionszone und aktivieren das Komplement-System. Chemotaktisch angelockte neutrophile und eosinophile Leukozyten sowie Mastzellen schädigen durch Freisetzung von Proteasen und Mediatoren wiederum die Hemidesmosomen und beeinträchtigen so die dermoepidermale Haftung (Fritsch 1998).

1.1.2.3 Klinik

Das BP ist gekennzeichnet durch das schubweise Auftreten von erbsen- bis haselnussgroßen, prallen Blasen auf normaler oder erythematöser Haut. Sie liegen subepidermal und sind daher relativ stabil, denn die Blasendecke besteht aus der gesamten Epidermis (Fritsch 1998). Besonders das untere Abdomen, die Innenseiten der Oberschenkel und Unterarme sowie Körperfalten gelten als Prädilektionsstellen. Schleimhäute sind selten betroffen. In der Regel bleibt die Erkrankung auf die Haut begrenzt und umfasst lediglich Blasen und deren

Folgeerscheinungen wie Erosionen und Narben. Durch Reduktion des Allgemeinzustands oder Superinfektionen kann es allerdings auch zu Systemerkrankungen und Organzeichen kommen. Ansonsten heilen die Erosionen oft auch spontan unter gelegentlichem Juckreiz von den Rändern ausgehend ab (Fritsch 1998).

1.1.2.4 Diagnose

Ältere Menschen mit gespannten Blasen auf ansonsten gesunder Haut deuten auf ein Bullöses Pemphigoid hin. Abgesichert wird die Diagnose histologisch, immunhistologisch sowie serologisch. Histologisch zeigen sich subepidermale Blasen, die nur mit Serum gefüllt sind. Die darunter liegende Dermis ist im oberen Korium mit Leukozyten chronisch-entzündlich infiltriert. Immunhistologisch fällt in der direkten Immunfluoreszenz an Kryoschnitten entlang der Basalmembran in vivo abgelagertes IgG und Komplement C ins Auge (Franzke et al. 2003). Im Serum der Patienten sind eventuell zirkulierende Autoantikörper gegen BPAG-1 und BPAG-2 nachweisbar (Schumann et al. 2000).

1.1.2.5 Therapie

Eine Immunsuppression durch systemische Glukokortikoidgabe ist angezeigt, in sehr hartnäckigen Fällen notfalls auch über Zytostatika und Immunsuppressiva wie Azathioprin (Effendy et al. 2005). Lokal reicht meist eine desinfizierende Behandlung (Rassner 1997).

1.1.2.6 Veterinärmedizinische Relevanz des BP bei Haussäugetieren

Das Bullöse Pemphigoid wurde bei Hund, Katze, Schwein und Pferd beobachtet und beschrieben (Iwasaki et al. 1995; Olivry et al. 1999; Olivry et al. 2000; Scott et al. 2000). Es stellt bei diesen Tierarten eine seltene Autoimmunkrankheit dar. Berichtet wurde vom BP in 0,01% bis 0,1% der dermatologischen Erkrankungen beim Hund, basierend aber nur auf klinischer Diagnose und Histopathologie. Nach einer Studie von Olivry im Jahr 1999 müssen diese Zahlen bei Antigennachweis noch mal drastisch nach unten korrigiert werden (Scott et al. 2000). Der Pathomechanismus entspricht dem des Menschen. Auch bei Tieren konnten zirkulierende Autoantikörper gegen bestimmte Epitope von Kollagen XVII, besonders Epitope der NC16A-Region, nachgewiesen werden (Olivry et al. 1999; Olivry et al. 2000; Scott et al. 2000).

Vermutlich kann das BP bei Tieren ebenfalls durch Medikamente, wie Penicillin, Furosemid oder Sulfonamide, provoziert werden, aber auch durch UV-Licht (Scott 1987; Ruocco et al. 1991). Bei Hunden wurde keine Geschlechts- und keine Altersdisposition beobachtet, wohl aber eine Rassedisposition für Collie, Dobermann (Scott 1987; Scott et al. 2000; Wiesner et al. 2000) und Sheltie (Niemand et al. 2001). Im Gegensatz zum Menschen sind bei den Haussäugetieren neben der Haut besonders auch mukokutane Übergänge und die Maulschleimhaut betroffen (Freudiger et al. 1997; Scott et al. 2000). In der seltener diagnostizierten, abgeschwächten Form beschränkt sich das BP auf Blasenbildung in Leiste und Achseln sowie auf mukokutane Übergänge an Anus und Präputium (Scott 1987). Meistens breitet sich die Krankheit aber generalisiert über den ganzen Körper aus. Makroskopisch gleicht sie dann dem Pemphigus vulgaris, der aber histologisch durch intradermale Spaltbildung gekennzeichnet ist (Freudiger et al. 1997). Die Bläschen platzen meist, statt ihrer findet man stark entzündete, ulzerative, gut begrenzte Hautveränderungen, die ineinander fließen und durch Pyodermien verkompliziert werden (Niemand et al. 2001). Schmerzhaftigkeit und Juckreiz sind sehr unterschiedlich (Scott et al. 2000). Veterinärmedizinische Diagnosestellung, Prognose und Therapie entsprechen dem humanmedizinischen Stand der Wissenschaft (Wiesner et al. 2000). Bei der Therapie ist jedoch zu beachten, dass Hunde meist erst auf sehr hohe Dosen an Glukokortikoiden ansprechen, 3 mg/kg Prednisolon alle 12 Stunden, was die Behandlung durch auftretende Nebenwirkungen erschwert (Scott et al. 2000).

1.2 Kollagen XVII

Kollagene sind charakteristische Strukturproteine der extrazellulären Matrix in allen Binde- und Stützgeweben. Sie sind der mengenmäßig wichtigste Faserbestandteil und machen bei Säugetieren circa 25 % der gesamten Körperproteine aus. In Organen sind sie nur in relativ geringen Anteilen vorhanden. Die Biosynthese von Kollagenen findet hauptsächlich in den Bindegewebszellen, den Fibroblasten, statt. Die Hauptfunktion der Kollagene besteht darin, Geweben und Organen mechanisch Stabilität zu verleihen (Löffler 1999; Stryer et al. 2003). Alle Kollagenmoleküle sind Trimere aus drei Polypeptidsträngen, genannt α -Ketten. Als spezifisches Merkmal bestehen diese Ketten aus repetitiven Gly-X-Y-Sequenzen, die für die stabförmige, tripelhelikale Struktur verantwortlich sind (Prockop et al. 1995; Stryer et al. 2003). Die

rechtsgängige Tripelhelix wird von drei α -Ketten mit linksgängiger Helixstruktur gebildet. Da den Polypeptidketten unterschiedliche Gene zu Grunde liegen können gibt es sowohl Homo- als auch Heterotrimere. Die drei Ketten sind über senkrecht zur Helixachse stehende Wasserstoffbrücken miteinander verbunden (Stryer et al. 2003). Essentiell für das Ausbilden der tripelhelikalen Struktur ist ein Glycin-Rest an jeder dritten Position der α -Kette, der als einzige Aminosäure ins Zentrum der Helix passt und der so ein Annähern der Ketten ermöglicht. Die X- und Y-Reste befinden sich außen an der Helix und binden dort geladene, hydrophobe Seitenketten. Diese Seitenketten sind für die spontane Polymerisation vieler Kollagene verantwortlich und bilden die Grundlage für Interaktionen mit anderen Molekülen (Prockop et al. 1995). Prolin und Hydroxyprolin binden oft an die X- oder Y-Position und stabilisieren das Kollagen durch Wechselwirkung vieler sterischer Effekte. Während früher nur Proteine mit großen tripelhelikalen Domänen den Kollagenen zugeordnet wurden, zählen heute auch Proteine mit kleinem tripelhelikalem und somit kollagenem Anteil zu dieser Klasse, auch wenn sie ansonsten weitgehend aus globulären, nicht-kollagenen Domänen bestehen (Prockop et al. 1995). Die vielfältigen Funktionen der Kollagene werden durch ihre strukturelle Verschiedenheit verdeutlicht.

Die Kollagenfamilie lässt sich in fibrillenbildende und nicht-fibrilläre Kollagene teilen (Löffler 1999). Die erste Gruppe zeichnet sich durch Bildung starrer, kollagener Mikrofibrillen aus, indem sich je fünf ununterbrochene Tripelhelices versetzt zusammenlagern und so beachtlich lange Ketten bilden. Zu dieser Gruppe, die 90% aller Körperkollagene beinhaltet, gehört z.B. Kollagen I, II und III.

Die heterogene Gruppe der nicht-fibrillären Kollagene ist nur in geringem Ausmaß im Körper vertreten. Sie befinden sich in sehr spezifischen Geweben, wie z.B. in der Basalmembran (Kollagen IV), oder haben ihre Aufgabe in der Interaktion mit anderen Kollagenen und Matrixproteinen (Kollagen VI). Auch Kollagen XVII, das dieser Arbeit zugrunde liegt, gehört dieser zweiten Gruppe an. Ihr gemeinsames Merkmal liegt in der Flexibilität, die durch die nicht-kollagenen Unterbrechungen der Tripelhelix zu begründen ist. Fibrilläre Domänen sind bei ihnen kürzer oder gar nicht vorhanden (Löffler 1999).

1.2.1 Die Entdeckung von Kollagen XVII

1986 wurde das Kollagen XVII erstmals beschrieben. Es wurde im Zusammenhang mit der Erforschung des Bullösen Pemphigoids (BP) gefunden. Da Kollagen XVII als zweites Autoantigen des BP entdeckt wurde, wird es auch als BPAG-2, beziehungsweise wegen seines Molekulargewichts als BP180, bezeichnet (Labib et al. 1986). Abnormalitäten des Kollagen XVII -Moleküls durch Mutationen oder Kollagen XVII -Autoantikörper gehen mit subepidermaler Blasenbildung der Haut einher. Von der Gruppe der Transmembran -Kollagene ist Kollagen XVII das am besten erforschte Protein (Franzke et al. 2003).

1.2.2 Vorkommen und Funktion

Kollagen XVII ist ein membrangebundenes, epitheliales Strukturprotein der Haut und der Schleimhäute, besonders vertreten in den basalen Keratinozyten. Als nicht-fibrilläres Transmembran-Kollagen spielt es eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Struktur von Hemidesmosomen (Zillikens et al. 1999; Franzke et al. 2003). Unter Hemidesmosomen versteht man etwa 0,5 μm große, charakteristische Zellstrukturen, die die Verbindung der Zellen zur Basalmembran herstellen und somit in der Haut für den dermoepidermalen Kontakt zuständig sind (Wiesner et al. 2000). Wie alle Transmembranmoleküle hat auch Kollagen XVII zwei Funktionen: zum einen als Rezeptor und zum anderen als Bestandteil der extrazellulären Matrix (Franzke et al. 2003; Powell et al. 2005).

1.2.3 Struktur

Das Transmembranprotein Kollagen XVII hat eine Typ-II-Orientierung, d.h. der N-Terminus des Proteins liegt intra- und der C-Terminus extrazellulär (Balding et al. 1997; Schmidt et al. 2000). Als homotrimeres Kollagen besteht Kollagen XVII aus drei identischen α -Ketten, die jeweils 1497 Aminosäuren lang und 180 kDa schwer sind (Giudice et al. 1992; Franzke et al. 2003). Mit einem Molekulargewicht von somit insgesamt 540 kDa ist Kollagen XVII das größte der Transmembrankollagene. Der intrazelluläre Abschnitt bildet einen globulären Kopf, darauf folgt ein kurzer Transmembranabschnitt, der mit dem membranproximal gestreckten und zum C-terminalen Ende hin sehr flexiblen extrazellulären Schwanz verbunden ist (Hirako et

al. 1998). Die zytosolische Endodomäne, auch NC16C genannt, umfasst 466 Aminosäuren und endet mit dem N-Terminus, der mit den intrazellulären Hemidesmosom-Proteinen assoziiert ist. Die gestreckte Ektodomäne ist 1008 Aminosäuren groß und besteht aus 15 kollagenen (COL1-COL15) und 16 nicht-kollagenen (NC1-NC16A) Domänen (Franzke et al. 2005). Die Nummerierung beginnt im Gegensatz zu anderen Kollagenen am C-terminalen Ende des Kollagens (Giudice et al. 1992). Die Kollagendomänen haben eine Größe zwischen 242 und 14 Aminosäuren (Giudice et al. 1992) und entsprechen dem typischen tripelhelikalen Bauplan aus drei Poly-(Gly-X-Y)-Ketten. Der juxtamembranöse Teil der Ektodomäne, der Bereich zwischen Zellmembran und dem ersten kollagenen Abschnitt, genauer die NC16A-Domäne (Balding et al. 1997), wird als „Linker Region“ (Junktionszone) bezeichnet. Diese Region, die eine so genannte „coiled-coil“-Struktur enthält, ist wahrscheinlich als Anfangsstruktur für die Trimerisierung des Kollagens verantwortlich (Areida et al. 2001; Franzke et al. 2004). Die Endo- und Ektodomäne des Kollagens sind, wie bei allen transmembranösen Kollagenen, durch eine einzelne, hydrophobe Transmembrandomäne über die Zellmembran verbunden (siehe Abbildung 1). Im Falle des Kollagen XVII umfasst diese als NC16B-Domäne benannte Region 23 Aminosäuren (Franzke et al. 2003).

1.2.4 Abspaltung der Ektodomäne von der Vollform des Kollagen XVII (Shedding)

Kollagen XVII kommt in zwei Formen vor: als Vollform, bestehend aus drei 180 kDa - schweren Ketten, und als lösliche Ektodomäne der Größe 120 kDa (Hirako et al. 1998; Schacke et al. 1998). Beide Formen sind in Abbildung 1 dargestellt, rechts schematisch und links im Immunoblot. Trotz zwei Proteinformen existiert jedoch nur eine mRNA, die für die Kollagen XVII-Vollform kodiert (Schacke et al. 1998).

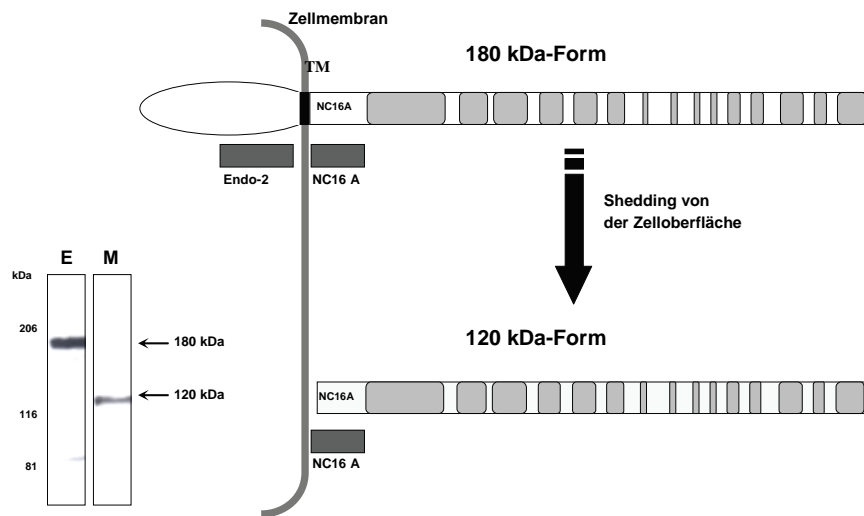


Abbildung 1: Schematische Darstellung der beiden Formen des humanen BP180-Proteins und eines Immunoblots. Modifiziert nach Franzke et al. 2003

180 kDa-Form (oben): Vollform des Kollagen XVII, **120 kDa-Form (unten rechts):** lösliche Ektodomäne von Kollagen XVII, **senkrechte graue Linie:** Zellmembran, **TM:** transmembranöse Region über die Zellmembran, **N-terminaler Anteil** (links der Zellmembran) liegt intrazellulär, **C-terminaler-Anteil** (rechts der Zellmembran) liegt extrazellulär, **graue Bereiche der Ektodomäne:** Kollagensequenzen, **weiße Bereiche der Ektodomäne:** nicht-kollagene Bereiche, **dunkelgraue Kästchen:** Epitop-Regionen für domänenspezifische polyklonale Antikörper (Franzke et al. 2002). Der Antikörper Endo-2 erkennt die intrazelluläre Domäne, der Antikörper NC16A dagegen die juxtamembranöse extrazelluläre NC16A-Sequenz der Ektodomäne.

Schaubild unten links: Immunoblots an Keratinozyten mit den oben genannten Antikörpern Endo-2 und NC16A: Zellextrakt (**E**) und Zellkultur-Medium (**M**). In den Zellextrakten ist die 180 kDa schwere Vollform des Kollagen XVII präsent (oberer Pfeil), im Kulturmedium konnte nur die 120 kDa-Ektodomäne (unterer Pfeil) nachgewiesen werden.

Biochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Kollagen XVII -Ektodomäne, katalysiert durch die ebenfalls membrangebundene Proteasen TACE, ADAM-9 und ADAM-10, in Höhe der „Linker Region“ konstitutiv von der Zelloberfläche freigesetzt wird. Dieser Vorgang wird als Shedding bezeichnet. Abbildung 2 verdeutlicht schematisch diese Freisetzung. Die lösliche Ektodomäne ist sehr stabil und kann neben der gebundenen Form im Körper nachgewiesen werden. Die Ablösung der Ektodomäne ist für viele physiologische Vorgänge der Keratinozyten essentiell, zum Beispiel zur Differenzierung oder bei der Wundheilung (Franzke et al. 2005). Die Zelle wird von einigen Bindungspartnern gelöst, was als Startsignal für neue Aufgaben gesehen werden kann. Die genauen Abläufe des Shedding sind komplex und in großen Teilen noch nicht bekannt.

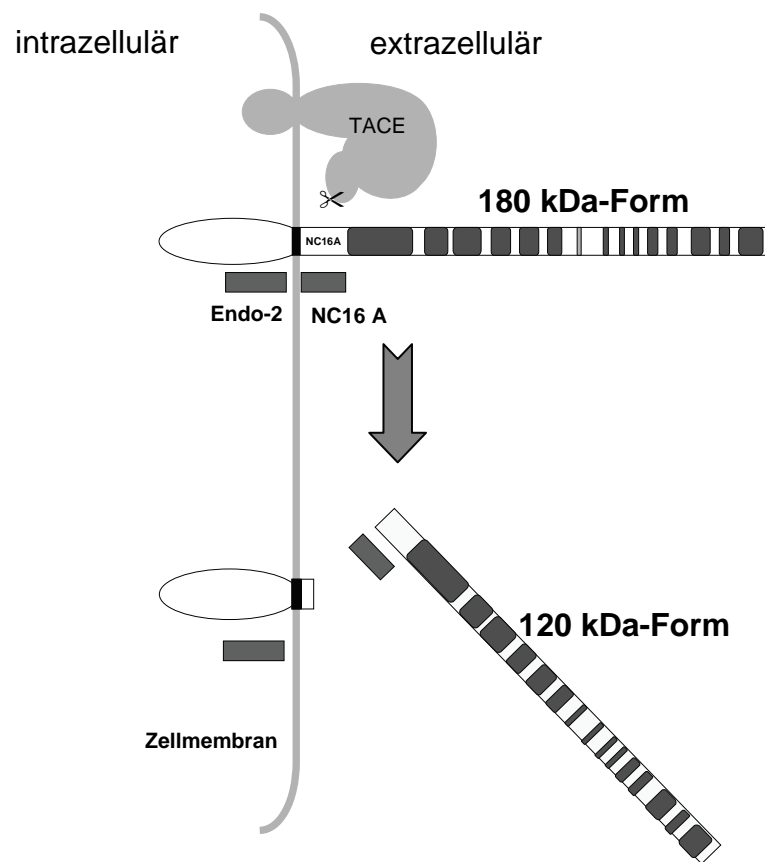


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Shedding-Vorgangs.

Die Ektodomäne wird von der Zelloberfläche durch die Proteinase TACE abgelöst (Franzke et al. 2002). **TACE:** ein membrangebundenes Enzym der ADAM-Familie (a disintegrin- and metalloproteinase) **180 kDa-Form (oben):** Vollform des Kollagen XVII, **120 kDa-Form (unten):** lösliche Ektodomäne des Kollagen XVII, **senkrechte graue Linie:** Zellmembran, **graue Bereiche der Ektodomäne:** Kollagensequenzen, **weiße Bereiche der Ektodomäne:** nicht-kollagene Bereiche, **dunkelgraue Kästchen:** Epitop-Regionen für domänenspezifische Autoantikörper (Franzke et al., 2002). Der Antikörper Endo-2 erkennt die intrazelluläre Domäne, NC16A-Antikörper dagegen die juxtamembranöse extrazelluläre NC16A-Sequenz der Ektodomäne.

Die als Kollagen XVII -Sheddasen bezeichneten Proteasen gehören der Familie der ADAMs (a disintegrin-and-metalloproteinase) an, die selbst integrierte Membranproteine sind und über Furinkonvertasen aktiviert werden müssen (Franzke et al. 2002; Hirako et al. 2003). Die Proteasenschnittstelle von Kollagen XVII befindet sich wahrscheinlich innerhalb der NC16A-Domäne im Bereich zwischen Aminosäure 528-547 (Franzke et al. 2005). Durch Einsatz von NC16A-Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass kein Shedding stattfindet, wenn dieser Abschnitt fehlt (Franzke et al. 2004). Viele Versuche weisen darauf hin, dass ADAM-17, auch bekannt unter dem Namen TACE (TNF-α converting enzyme), die Hauptsheddase von Kollagen

XVII darstellt (Franzke et al. 2002). TACE ist auch für die TNF- α -Freisetzung verantwortlich (Black et al. 1997). TNF- α , auch Kachexin genannt, hat wiederum proinflammatorische Wirkung indem es Makrophagen aktiviert (Mirastschijski et al. 2005). Der ebenfalls in dieser Arbeit untersuchte physiologische Haupt-Inhibitor von TACE heißt TIMP-3 (*Tissue-inhibitor of metalloproteinases*) (Amour et al. 1998). TIMP-3 bindet mit der nicht inhibitorisch aktiven Seite an die extrazelluläre Matrix und ist somit in unmittelbarer Umgebung von Enzym und Substrat lokalisiert.

1.2.5 Beide Formen von Kollagen XVII sind Autoantigene des Bullösen Pemphigoids

Die im Zusammenhang mit dem Bullösen Pemphigoid auftretenden gewebsgebundenen und zirkulierenden IgG -Autoantikörper sind hauptsächlich gegen Epitope in der NC16A -Sequenz und zu 30% gegen den COOH-Terminus der BP180-Ektodomäne gerichtet (Hofmann et al. 2002; Thoma-Uszynski et al. 2004). Verschiedene IgG-Klassen detektieren dabei das gleiche Epitop (Suzuki et al. 1994). Sowohl die Vollform als auch die abgelöste Ektodomäne wird von zirkulierenden IgG- und IgA -Antikörpern detektiert (Schumann et al. 2000). Die alleinige Bindung von Autoantikörpern führt jedoch noch nicht zur Blasenbildung. Zusätzlich ist das Einwandern von Entzündungszellen in die Haut und die Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren einschließlich Zytokinen und Proteasen eine zwingende Voraussetzung (Zone et al. 1990; Schumann et al. 2000). Das Bullöse Pemphigoid ist immunhistopathologisch gekennzeichnet durch IgG- und Komplement C3-Ablagerungen entlang der Basalmembran der Haut. Das BP180 spielt jedoch auch bei anderen Immundermatosen eine Rolle als Antigen, so zum Beispiel im Zusammenhang mit dem Pemphigoid gestationis (PG) oder der Linearen IgA-Dermatose (LAD) (Haase et al. 1998; Zillikens 2002; Hirako et al. 2003). Interessanterweise beruht die Auslösung der Linearen IgA -Dermatose ebenfalls auf Antikörpern gegen die gescheddete Kollagen XVII 120-kDa-Ektodomäne (daher auch LAD-1 genannt), beziehungsweise gegen ein 97 kDa-großes Teilstück von dieser (LABD97). Diese Ektodomänen-Form ist am C-Terminus verkürzt, wahrscheinlich durch Einwirkung von Proteasen (Zone et al. 1990; Marinkovich et al. 1996). Jedoch enthält LABD97 auch die Haupt-Epitop-Domäne NC16A (Zone et al. 1998). Im Falle der LAD spielen im Gegensatz zum BP nicht IgG sondern IgA die Hauptrolle, welche

allerdings zum Teil die gleichen Epitope erkennen wie die IgG des BP (Zillikens et al. 1999). Bei der LAD erkennen die Antikörper aber nie die Vollform von BP180 (Hirako et al. 2003).

1.2.6 Das Gen von Kollagen XVII

Kollagen XVII wird durch das Gen COL17A1 kodiert. Dieses Gen konnte dem langen Arm von Chromosom 10 zugeordnet werden (Li et al. 1991). Mutationen in diesem Gen führen zu gänzlichem Fehlen von Kollagen XVII oder zu einem strukturell veränderten Protein. Folge sind Adhäsionsprobleme der Epidermis und Blasenbildung. Ein Beispiel für eine angeborene Gendermatose ist die Junktionale Epidermiolysis Bullosa (JEB) (McGrath et al. 1995).

1.3 Plasmin und seine Aktivatoren

1.3.1 Plasmin und die proteolytische Kaskade

Plasmin ist ein Schlüsselenzym der Blutfibrinolyse (siehe Abbildung 3) indem es das Fibrin in seine Fragmente spaltet. Es sammelt sich um Wunden, entzündetes Gewebe und Tumoren an und trägt hier zum Umbau und zur Reparatur des Gewebes bei. Eine wichtige Rolle spielt Plasmin auch durch dessen Fähigkeit direkt extrazelluläre Matrixproteine und Matrixmetalloproteinasen (MMPs) zu degradieren (Mullins et al. 1983). Es stellt eine doppelkettige Serinproteinase dar und wird durch Plasminogenaktivatoren (PA) aus dem Proenzym Plasminogen zu der aktiven Form Plasmin proteolytisch aktiviert (Robbins et al. 1967). Plasminogen, der inaktive Enzymvorläufer der Protease Plasmin, wird in der Leber gebildet und ins Plasma sezerniert. Über das Plasma tritt Plasmin in alle entzündlichen Gewebe ein, so auch in Blasen der Haut. Im Blasenserum des Bullösen Pemphigoids kann Plasmin immer in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden. Plasmin wird von den meisten Serinproteinase -Inhibitoren gehemmt, so z.B. auch von Leupeptin.

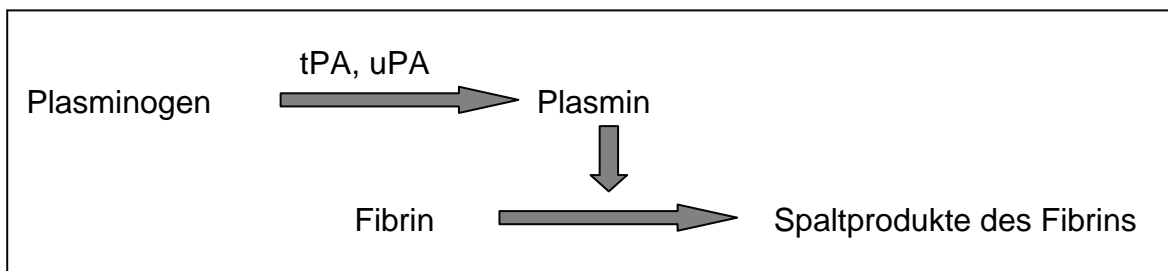


Abbildung 3: Schematische Darstellung der proteolytischen Kaskade bei der Fibrinolyse

Die Plasminogenaktivatoren bilden aus der inaktiven Vorstufe Plasminogen das aktive Enzym Plasmin. Dieses wiederum spaltet Fibrin in Fragmente auf. Plasmin wirkt also fibrinolytisch und antikoagulatorisch.

1.3.2 Plasminogenaktivatoren (PA)

Plasminogenaktivatoren (PA) sind körpereigene Enzyme, die unter anderem auch von normalen humanen Keratinozyten produziert werden. Es gibt verschiedene Arten dieser Proteine, wie z.B. den *Urokinase-type PA* (uPA) oder den Gewebe-Typ *Tissue-type PA* (tPA). Die Fibrinolyse wird von zwei Systemen gesteuert: intrinsisch und extrinsisch. Zum intrinsischen System gehören Plasminogenaktivatoren des Blutplasmas wie beispielsweise die Blutgerinnungsfaktoren XI und XII, zum extrinsischen System gehören die Plasminogenaktivatoren des Gewebes wie tPA und uPA. Als weitere Funktion bindet besonders uPA an den spezifischen zellulären Rezeptor u-PAR, was die Aktivität des zellgebundenen Plasminogen erhöht (Lijnen 2002). Plasminogenaktivatoren reduzieren die Zelladhäsion, indem sie die extrazelluläre Matrix degradieren und spielen so bei der Blasenbildung des Bullösen Pemphigoids eine Rolle (Jensen et al. 1990).

Dagegen wird die Zelladhäsion durch Fibrinolyse-Inhibitoren verstärkt (Hellebrekers et al. 2000; Mirastschijski et al. 2005). Außerdem ist das Plasminogensystem in Kombination mit den Matrixmetalloproteinasen am Gewebsheilungsprozeß beteiligt. Plasminogenaktivatoren finden auch klinischen Einsatz, so z.B. Streptokinase oder rekombinantes humanes tPA in der Thrombolyse-Therapie.

1.3.3 Der Nachweis von Plasminogenaktivatoren in dieser Arbeit

In diese Arbeit wurde zusätzlich auch die Expression der Plasminogenaktivatoren (PA) in Keratinozyten mit aufgenommen, da 2004 erstmals stark erhöhte Plasmin-

und Plasminogenaktivatoren -Spiegel in Blasenflüssigkeit von Bullösen Pemphigoid-Patienten beschrieben wurden (Schmidt et al. 2004). Damals wurde die These aufgestellt, dass es durch Bindung von Antikörpern an BP180 zur Freisetzung von uPA und tPA aus den Keratinozyten kommt und damit der Plasminspiegel steigt (Schmidt et al. 2004). Für tPA und Plasmin konnte dies in der Studie belegt werden. In bisher nicht veröffentlichten Studien an Keratinozytenkulturen oder aufgereinigtem Kollagen XVII (persönliche Mitteilung Dr. Franzke) konnte gezeigt werden, dass Plasmin auch direkt vom Kollagen XVII-Molekül eine 97 kDa -schwere Ektodomäne, wie das LABD97 abspalten kann. Diese Abspaltung ist mit einer pathologischen Fragmentierung gleichzusetzen. Im Gegensatz zum Shedding ist dieser Vorgang unphysiologisch, also nicht von einem kontrollierten Enzymsystem gesteuert. Die lösliche Form ist kürzer als die von TACE abgespaltene 120 kDa –Form, da ihr am C-terminalen Ende Domänen fehlen. Aber auch LABD97 beinhaltet die NC16A-Domäne und könnte so zum Verlust der natürlichen Toleranz gegen BP180 bei der Entstehung des Bullösen Pemphigoids beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde von der Hypothese ausgegangen, dass ältere Menschen möglicherweise mehr Plasminogenaktivatoren bilden und somit potentiell mehr Plasmin aktivieren können. Dieses würde die Wahrscheinlichkeit der vermehrten Entstehung des LABD97 und somit die Auslösung des Bullösen Pemphigoids erhöhen.

1.4 Ziel und Hintergrund dieser Arbeit

In dieser Studie sollte die Beteiligung von Kollagen XVII bei der Entstehung von blasenbildenden Autoimmunkrankheiten der Pemphigoid-Gruppe, insbesondere dem Bullösen Pemphigoid, untersucht werden. Da beide Formen von Kollagen XVII als Hauptautoantigen erkannt werden und diese Erkrankung beim Mensch erst im fortgeschrittenen Alter (>50 Jahre) auftritt, wurden altersbedingte Veränderungen von Kollagen XVII analysiert. Der Versuchsansatz ging von Hautproben von jeweils 15 jungen (Alter zwischen 0-12 Jahren) und 23 alten (Alter >50 Jahre) Probanden aus. Von den Hautproben wurden Zellen für die Zellkultur gewonnen, an denen dann die Expression von Kollagen XVII und dessen Proteasen, sowie die Ektodomänen - Freisetzung auf molekularbiologischer und proteinchemischer Basis bestimmt wurden. Von dieser Studie erhofften wir uns Aufschluss darüber, ob es im Alter zu Veränderungen in der Biologie des Kollagen XVII kommt, die zur Entstehung des Bullösen Pemphigoids beitragen. Es wurde in dieser Arbeit von der These ausgegangen, dass eine gegebenenfalls erhöhte Expression von Kollagen XVII bei älteren Menschen und/ oder vermehrtes Kollagen XVII -Shedding zum Erreichen des Hypersensibilisierungs -Schwellenwertes beiträgt. Dadurch könnte das Auftreten von BP -Autoantikörpern und somit die Erkrankungshäufigkeit bei älteren Menschen erklärt werden.

Kapitel 2

Materialien

2.1 Geräte

Agarosegelkammer	Biometra, Göttingen
Blotkammer	Biometra, Göttingen
Brutschrank HeraCell 240	Heraeus, Hanau
Gel Jet Imager 2000 (Dokumentation)	Intas GmbH, Göttingen
Heizblock „Test Tube Thermostat“	Roth, Karlsruhe
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop CKX 41	Olympus, Stuttgart
Magnetrührer KMO2	Janke & Kunkel, Staufen
pH-Elektrode	Sartorius, Göttingen
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipettboy plus	TecnoMara, Wallisellen (CH)
Schüttelplattform Duomax 1030T	Heidolph, Darmstadt
Spannungsquelle „PowerPac 300“	Bio-Rad, München
Spannungsquelle „PowerPac P30“	Biometra, Göttingen
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau
Thermocycler „Mastercycler gradient“	Eppendorf, Hamburg
Thermolab Multiskan Ex	ThermoLabsystems (China)
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Wasserbad GFL	Lauda, Königshofen
Zentrifuge „Labofuge 400e“	Heraeus, Hanau

2.2 Verbrauchsmaterialien

Blotting-Papier 3MM Chr	Whatman, Kent (GB)
Kryoröhrchen (1 ml)	Nunc, Wiesbaden
Küvetten	Eppendorf, Hamburg

Mikrotiterplatten (96 well-Elisa-Reader-Platten)	Nunc, Wiesbaden
Nitrocellulosemembran Protran BA 85	Schleicher & Schuell, Dassel
Petrischalen, steril	Falcon, Heidelberg
Pipetten „Costar Stripette 5/ 10/ 25 ml“	Corning Inc., Corning (USA)
Polypropylenröhrchen 15/ 50 ml	Falcon, Heidelberg
Sterilfilteraufsatz für Spritzen Millex 0,22 µm	Millipore, Molsheim
Zellkulturflaschen 25 cm ² / 70 ml	Falcon, Heidelberg
Zellschaber, 23 cm	Nunc, Wiesbaden

2.3 Chemikalien

Acrylamidstammlösung, 30% mit 0,8% Bisacrylamid	Roth, Darmstadt
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
APS, 10% (w/v)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Antibiotika/ Antimykotika	Invitrogen, Karlsruhe
Antipain	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
BCIP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Fluka, Taufkirchen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Chymostatin	Fluka, Taufkirchen
Citronensäure-Monhydrat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM	MP Biomedicals, Eschwege
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromidlösung, 10 mg/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Roth, Karlsruhe
FCS	Biochrom AG, Berlin
Glycerin	Roth, Darmstadt
Glycin	Roth, Darmstadt
Harnstoff	Qiagen, Hilden
Leupeptin	Fluka, Taufkirchen

Magermilchpulver	Humana, Herford
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nonidet P40	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS-Dulbecco	Invitrogen, Karlsruhe
Pefabloc SC	Merck, Darmstadt
Pepstatin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Prestained SDS-PAGE Standards	Bio-Rad, München
rEGF	Invitrogen, Karlsruhe
Rinderhypophysenextrakt (BPE)	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SFM + Supplements (EGF+BPE)	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trizma base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/ EDTA in PBS (0,05%/ 0,02%)	Biotech, Ebersberg

2.4 Häufig verwendete Lösungen

Blue sample buffer (BSB) für SDS-Page	0,8 M Harnsäure 0,1 M Tris-HCl, pH 6,8 2% SDS 5% Glycerol 1 mM DTT 0,0001% Bromphenolblau
Acrylamidlösung	30% Acrylamid-Stammlösung + 0,8% Bisacrylamid
TBE-Puffer	1 M Tris 1 M Borsäure 20 mM EDTA

TBS	0,15 M NaCl 0,05 M Tris, pH 7,6
PBS	0,138 M NaCl 0,0027 M KCl pH 7,6
Sammelpuffer (4,5%ig) für Gelelektrophorese	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,1% SDS
Trenngelpuffer (7%ig) für Gelelektrophorese	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,1% SDS
Laufpuffer für Gelelektrophorese	25 mM Tris, pH 8,3 192 mM Glycin 0,1% SDS
Elektrotransferpuffer für Immunoblot	25 mM Tris, pH 8,3 192 mM Glycerol 0,1% SDS 20% Methanol
Lysispuffer	1% Nonidet P-40 20 mM Tris/ HCl, pH 7,4 100 mM NaCl
Lysispuffer mit Inhibitoren	Lysispuffer 1% 200 mM EDTA 1% 100 mM Pefabloc 1% Chymostatin 1% Antipain 1% Pepstatin 1% Leupeptin

Inkubationspuffer P3	100 mM Tris, pH 9,5 100 mM NaCl
NBT-Stammlösung	50 mg/ ml in 70% Dimethylformamid
BCIP-Stammlösung	50 mg/ ml in 100% Dimethylformamid

2.5 Marker

Trackit 100 bp DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Prestained SDS-PAGE Proteinstandards	Bio-Rad, München (s. Tab.1)

Tabelle 1: SDS-PAGE Proteinstandards

Marker	Protein	Molekulargewicht/ kDa
Low Range (LR)	Phosphorylase B	103
	Rinderserumalbumin	77
	Ovalbumin	50
	Carboanhydrase	34,3
	Soja-Trypsininhibitor	28,8
	Lysozym	20,7
High Range (HR)	Myosin	204
	β-Galactosidase	123
	Rinderserumalbumin	80
	Ovalbumin	48

2.6 Antikörper

2.6.1 Primäre Antikörper gegen Kollagen XVII aus Kaninchen

Endo-2 laboreigene Herstellung

Polyklonale Kaninchen-AK gegen die intrazelluläre Kollagen XVII-Endodomäne. Das Antiserum wurde nach Immunisierung mit einem rekombinant hergestellten Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein eines Teilfragments der Endodomäne (AS 367-466) gewonnen. Die Spezifität für Kollagen XVII wurde zuvor erfolgreich nachgewiesen (Franzke et al. 2002).

Verdünnung 1:1000

NC16A laboreigene Herstellung

Polyklonale Kaninchen-AK gegen die extrazelluläre Kollagen XVII-NC16A Domäne. Das Antiserum wurde nach Immunisierung mit einem rekombinant hergestellten GST-Fusionsprotein der NC16A Domäne (AS 490-566) gewonnen. Die Spezifität für Kollagen XVII wurde zuvor erfolgreich nachgewiesen (Schumann et al. 2000).

Verdünnung 1:1000

Anti- γ -Tubulin Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Polyklonale Kaninchen-AK (Bindungsregion AS 38-53)

Verdünnung 1:5000

2.6.2 Sekundärer Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen-AK

Polyklonale Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege Sigma-Aldrich, Taufkirchen

AP-gekoppelt

Verdünnung 1:20000

2.7 Molekularbiologische Kits

Dc Protein Assay (Reagent A,B,S)

Bio-Rad, München

QIAamp RNA Blood Mini Kit

Qiagen, Hilden

Titan One Tube RT-PCR-Kit

Roche, Mannheim

Kapitel 3

Methoden

3.1 Zellkultur

Sämtliche Arbeiten mit den Zellkulturen wurden unter sterilen Arbeitsbedingungen durchgeführt. Medien- und Pufferüberstände wurden mit Hilfe von Pasteurpipetten und einer Membranvakuumpumpe abgesaugt.

3.1.1 Kultivierung von humanen Hautzellen

Der Versuchsansatz hatte einen Stichprobenumfang von insgesamt 38 humanen Probanden, bestehend aus 15 jungen (alle männlich; Alter unter 12 Jahren) und 23 alten Menschen (6 weiblichen und 17 männlichen; Alter zwischen 51 und 92 Jahren), von denen Hautproben entnommen wurden.

Die Hautproben der jungen Probanden waren Vorhäute aus der Urologie des Universitätsklinikums Freiburg, die Proben der alten Probanden entstammten der Hautklinik des Universitätsklinikums Freiburg und bestanden aus gesunder, belichteter Haut. Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der Studie „Entzündliche Autoimmunkrankheiten der Haut: Molekulare Charakterisierung des Autoantigens Kollagen XVII“ (Forschungsvorhaben Nr. 44/03) durchgeführt. Dabei fand die Arbeit als Substudie Nr. 299/ 05 zur Untersuchung altersbedingter Veränderungen von Kollagen XVII statt. Sie wurde durch die Ethikkommission der Albert-Ludwig-Universität Freiburg positiv begutachtet. Von den Hautproben wurden Keratinozyten für die Zellkultur gewonnen, an denen die Expression von Kollagen XVII und deren Proteasen, sowie die Ektodomänen-Freisetzung auf molekularbiologischer und proteinchemischer Basis bestimmt wurden. Die Zellen wuchsen in serumfreiem Keratinozyten-Medium supplimentiert mit rekombinantem epidermalem Wachstumsfaktor rEGF und Rinderhypophysenextrakt BPE (Boyce et al. 1983). Alle Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C unter Wasserdampfsättigung und mit einer CO₂-Begasung von 5% kultiviert. Als Kulturgefäße dienten 25 cm²-

Zellkulturflaschen, die mit 7,5 ml vorgewärmtem Medium befüllt wurden. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel und täglich eine optische Kontrolle des Wachstumsverhaltens.

3.1.2 Isolierung der Keratinozyten aus humanen Hautbiopsien

Die Hautproben wurden postoperativ in sterilem, serumfreiem Medium mit DMEM, Hepes und 1% Antibiotika/ Antimykotika bei +4°C für maximal drei Tage bis zur Präparation aufbewahrt. Zur Gewinnung von Primärkulturen der Keratinozyten wurde eine menschliche Hautbiopsie mechanisch von Blut und Fettgewebe befreit und mehrmals mit PBS mit 10% Antibiotika/ Antimykotika sorgfältig gespült. Sodann wurde die Probe in einer sterilen Petrischale präpariert. Die Dermis wurde so weit wie möglich entfernt und die übrige Epidermis wieder mehrfach in PBS mit 10% Antibiotika/ Antimykotika gewaschen. Die in kleine 5 x 5 mm große Stückchen zerschnittene Probe wurde in 30 ml PBS mit Trypsin/ EDTA (0,05%/ 0,03%) überführt. Die bei +37°C im Brutschrank durchgeführte nichtenzymatische Ablösung der Keratinozyten dauerte je nach Hautprobe etwa 60 bis 90 Minuten. Alternativ konnte auch im Kühlschrank bei +4°C über Nacht trypsinisiert werden. Nach dieser Zeit war ein Abspalten der Epidermis von der Dermis zu erkennen und die Trypsinisierung wurde durch Umtransferieren der Hautstückchen in eine zweite Petrischale mit 30 ml PBS und 10% FCS gestoppt. Die epidermale Seite der Hautstückchen wurde vorsichtig mit einer Pinzette abgeschabt um möglichst viele Keratinozyten zu bekommen. Das dermale Bindegewebe wurde entfernt. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in Suspension gebracht und sodann in einem 50 ml-Falcon-Röhrchen bei 200 g für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Zellsediment in 7,5 ml körperwarmem Keratinozyten-Medium gelöst und in eine 25 cm²-Kulturflasche überführt. Für eine Primärkultur in einer 25 cm²-Flasche benötigt man etwa 1 cm² Haut. Die Zellkulturen wurden mikroskopisch auf Zellkontaminationen von Fibroblasten oder Melanozyten untersucht, wobei nur Kulturen für die Versuche benutzt wurden, die mindestens 90% Keratinozyten enthielten. Die Zellen wurden nun bei +37°C und 5% CO₂ in Keratinozyten-Medium inkubiert.

3.1.3 Passagieren der Zellen

Die Passage konfluenten Kulturen (d.h. die Zellen bedeckten den Boden der Zellkulturflasche vollständig einschichtig) in mehrere Kulturflaschen erfolgte durch Zugabe von Trypsin, welches ein Ablösen der Zellen vom Untergrund bewirkt.

Nach Absaugen des Mediums wurde die Zellschicht mit PBS gewaschen, um eine Hemmung des Trypsins durch Serumreste auszuschließen. Danach erfolgte die Zugabe von 2 ml Trypsin/ EDTA. Nach etwa fünf Minuten konnte eine Ablösung des Zellrasens beobachtet werden. Die Enzymwirkung wurde durch Zugabe von 4 ml PBS mit 10% FCS gestoppt. Um die Zellen nicht zu schädigen sollte die Inkubationszeit so kurz wie möglich gehalten werden. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml -Polypropylenröhrchen gefüllt, bei 200 g für fünf Minuten abzentrifugiert und das Zellpellet dann mit je 7,5 ml vorgewärmtem Medium in neue Kulturschalen überführt.

Je Proband wurden drei Kulturplatten angezüchtet, eine zur Proteinanalyse, eine zur RNA-Analyse und eine um sie als Reserve im flüssigen Stickstoff tiefzufrieren.

3.1.4 Einfrieren von Keratinozyten

Vor dem Tiefgefrieren wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsinisiert und abzentrifugiert. Das Sediment einer 25 cm²-Kulturflasche wurde in 1 ml Einfriermedium, bestehend aus Keratinozyten-Medium und 10% DMSO als Kryoprotektans, aufgenommen und in ein 1 ml -Kryoröhrchen überführt. Nach einer Aufbewahrung bei -80°C über Nacht setzte man die Kryogefäße am nächsten Tag in einen Flüssigstickstoff-Container um, in dem sie auf diese Art mehrere Jahre konserviert und somit haltbar sind.

3.1.5 Auftauen von Keratinozyten

Die aus dem Container mit Flüssigstickstoff entnommenen Kryoröhrchen wurden kurz geöffnet um eingedrungenen Stickstoff entweichen zu lassen. Dann fand das Auftauen der Zellen bei Zimmertemperatur statt, wonach ein rasches Überführen in eine Zellkulturflasche mit vorgewärmtem Medium nötig war. Gleich am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt um noch vorhandene DMSO -Reste zu entfernen.

3.1.6 Ascorbat-Behandlung der Keratinozyten

Die an der Kollagen-Biosynthese beteiligten Enzyme Prolin-Hydroxylase und Lysin-Hydroxylase, das sind Dioxygenasen mit einem Eisen (II)-Atom im aktiven Zentrum, benötigen Ascorbat als Reduktionsäquivalent bei der Hydroxylierung von Prolin zu 4-Hydroxyprolin und von Lysin zu 5-Hydroxylysin. Dieses Reduktionsmittel hält das Eisenatom im zweiwertigen Zustand und gewährleistet damit katalytische Aktivität der Enzyme. Die Hydroxylierungsreaktion findet an spezifischen Stellen der langen Polypeptidseitenketten statt, bevor diese helikale Struktur annehmen, was eine Lokalisation des Prolinrestes auf der Aminoseite eines Glycinrestes erfordert (Stryer et al. 2003). Ein weiteres Enzym hydroxyliert einige Prolinreste am C-3, falls sich diese auf der Carboxylseite eines Glycinrestes befinden. Diese Hydroxylierungen bewirken eine Stabilisierung der tripelhelikalen Struktur von Kollagenen und sind damit für die Ausbildung von funktionsfähigen Kollagenmolekülen unerlässlich. Die Ascorbatzugabe erfolgte bei einsetzender Subkonfluenz der Kulturen.

48 Stunden vor der Extraktion wurden die Zellen durch Zugabe von Ascorbat (5 mg Ascorbat pro ml H₂O) zur Bildung von Kollagen stimuliert (Prockop et al. 1995). Pro 25 cm²-Flasche wurden 7,5 ml Keratinozyten-Medium mit allen Zusätzen (1% AA, EGF, BPE) und 75 µl Ascorbat (Stocklösung 10 µl / ml) zugegeben. Nach diesen 48 Stunden wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und einmal mit PBS gespült.

Nun folgte die Shedding-Assay: Zugabe von 5 ml Mangelmedium (Keratinozyten-Medium mit 1% AA, EGF, ohne BPE) mit 50 µl Ascorbat und fünf Stunden Inkubation bei 37°C im Brutschrank.

3.2 Proteinanalyse

3.2.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Keratinozyten

Die Extraktion benötigte insgesamt 2,5 Tage Vorlaufzeit in der die Zellen wie oben beschrieben mit Ascorbat inkubiert wurden. Dies galt auch für RNA-Extrakte. Das Detergenz Nonidet P40 solubilisiert die schwer löslichen Basalmembranproteine und führt zur Zelllyse. Die zugesetzten Proteinase-Inhibitoren EDTA und Pefabloc sollten den enzymatischen Proteinabbau im Verlauf der Probenaufbereitung einschränken,

wobei EDTA Metalloproteasen hemmt, Pefabloc dagegen inhibiert Serinproteasen und Proteinase K.

Zur Proteinextraktion wurden die 5 ml Mangelmedium abgenommen und in einem 15 ml -Zentrifugenröhrchen mit 50 µl EDTA und 50 µl Pefabloc bei 200 g für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in neues Röhrchen überführt und im Gefrierschrank bei -80°C gelagert (Zone et al. 1996).

Der Zellrasen wurde zweimal mit +4°C -kaltem PBS gewaschen und dann nach Zugabe von 330 µl Lysispuffer (Marinkovich et al. 1996; Schacke et al. 1998) pro 25 cm² -Zellkulturflasche 30 Minuten auf Eis geschüttelt.

Danach wurden die angelösten Zellen mit einem Zell-Schaber vom Gefäßboden abgekratzt, in ein 1,5 ml -Eppendorfgefäß pipettiert und in der Biofuge 30 Minuten bei +4°C und 13000 U/ min zentrifugiert. Dann wurde der Überstand zu je 100 µl in Eppendorfgefäße aliquotiert und ebenfalls bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Proteingehaltsbestimmung

Die Proteingehalte der Zellextrakte wurden mit dem DC Protein Assay (detergent compatible (DC) Protein Assay Kit von Bio-Rad, modifizierte Lowry Assay (Lowry et al. 1951)) im Thermolab Multiscan bestimmt, der Proteinbestimmungen bei einer Wellenlänge von 650 nm spektrophotometrisch ermöglichte. Dieser Schritt ist zum einen wichtig, damit die gleichen Mengen an Protein für die SDS-PAGE-Auftrennung eingesetzt werden konnten. Zum anderen galten diese Proteinwerte als Maß für die Zellzahlen, um so die jeweiligen Mengen an Medium für die Fällung (Methanol/ Chloroform-Fällung) zu bestimmen.

Gemessen wurde in 96 Loch-Mikrotiter-Platten (ELISA-Reader-Platten) im Doppelansatz, einmal mit 5 µl der Proteinprobe und einmal mit je 2,5 µl Probe und 2,5 µl Lysispuffer. Die Färbelösungen wurden gemäß DC Protein Assay -Handbuch angesetzt und zugegeben. Nach Durchmischen und 15 Minuten Wartezeit folgte das Auslesen der Absorptionen bei 650 nm und die Bestimmung der Proteingehalte der Proben mit Hilfe einer Eichgraden und dem Computerprogramm Ascent Software Multiscan.

3.2.3 Methanolpräzipitation der Proteine und Vorbereitung der Proben auf die Gelelektrophorese

Vorbereitend wurden die Proben zuerst mit dem gleichen Volumen Methanol und 20% des totalen Volumens Chloroform durch 30 Sekunden Vortexen gut gemischt. Das Methanol fällte dabei die Probe. Nach Zentrifugation bei 13000 U/ min für fünf Minuten bei +4°C in der Biofuge wurde die obere, wässrige Phase vorsichtig abpipettiert. Dann wurde nochmals das gleiche Volumen Methanol wie beim ersten Mal zugefügt, durch Vortexen für 30 Sekunden wieder gut gemischt und nochmals bei 13000 U/ min für zehn Minuten bei +4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und das Pellet durfte einige Minuten lufttrocknen. Nach Resuspendieren des Pellets in BSB-Puffer wurde die Lösung bei +95°C für fünf Minuten erhitzt. Das im BSB-Puffer im Überschuss vorhandene Detergens SDS sorgt in Kombination mit der 95°C-Inkubation für die Auflösung der Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine indem es die Wasserstoffbrückenbindungen aufbrach. DTT führt zu einer quantitativen Reduktion von Disulfidbrücken zu Thiolgruppen und bewirkt auf diese Weise die Denaturierung der Tertiärstruktur der Proteine in Kombination mit Detergenzien. Das führt zur Dissoziation der α -Ketten, die dann beim Nachweis der Vollform von Kollagen XVII durch Western Blot -Analyse eine Bande bei 180 kDa zeigen.

3.2.4 Diskontinuierliche SDS-PAGE zur Auftrennung der Proteine

Die gelelektrophoretische Auftrennung fand unter denaturierenden (SDS) und reduzierenden (DTT) Bedingungen wie oben näher erläutert statt. Die SDS-Anionen binden im definierten Zahlenverhältnis von etwa zwei Anionen pro Aminosäure an die Aminosäurereste der Hauptketten. Dabei entsteht ein Komplex, dessen stark negative Ladung in etwa der Masse des Proteins proportional ist. Die Beweglichkeit der Proteine im Gel ist dem Logarithmus ihrer Masse direkt proportional (Laemmli 1970).

Das Gel zur Elektrophorese besteht aus langen linearen Polyacrylamidketten, die durch N,N'-Methylbisacrylamid quervernetzt sind. Die Porengröße des Gels kann je nach Größe der aufzutrennenden Proteine durch den Anteil an beiden Substanzen variiert werden. Die Polymerisationsreaktion wird durch freie APS-Radikale induziert. TEMED, das die Entstehung von freien Radikalen katalysiert, beschleunigt diese

Reaktion. Das diskontinuierliche Gelsystem zeichnet sich durch ein engmaschiges Trenngel und ein darüber gelagertes weitmaschiges Sammelgel aus. Durch unterschiedliche Zusammensetzung und unterschiedlichen Puffer-pH wird ein pH- und Spannungs-Gradient erzeugt. Dies bewirkt eine Fokussierung der Proteine im oberen Sammelgel, bevor eine Auftrennung in distinkte Banden im unteren Trenngelabschnitt erfolgt.

Es wurde das Minigel-System von Biometra gemäß Tabelle 2 verwendet.

Tabelle 2: Pipettierschema für Minigele (Biometra)

	Trenngel 7 % Σ 7,5 ml	Sammelgel 4,5 % Σ 2,5 ml
H₂O	3875 µl	1500 µl
Trenngelpuffer	1875 µl	625 µl
Acrylamid/Bisacrylamid	1750 µl	375 µl
TEMED	7,5 µl	2,5 µl
APS 10 % (w/v)	75 µl	25 µl

Für eine gleichmäßige horizontale Trennlinie zwischen den beiden Geltypen überschichtet man das Trenngel nach dem Gießen mit Wasser bis es nach spätestens 30 Minuten polymerisiert ist. Nach Absaugen des Wassers, Überschichten mit Sammelgel und dessen Polymerisation wurden die Proben aufgetragen. Zur späteren Molekulargewichtsbestimmung wurden die Proben möglichst beidseitig von je 7 µl eines kommerziell erhältlichen Proteinmarkers flankiert. Zur Elektrophorese ließ man die Proben bei einer geringen Stromstärke von 10 mA in das Gel einlaufen und sich da fokussieren. Bei Erreichen des Trenngels nach etwa zehn Minuten wurde die Spannung erhöht, so dass eine Stromstärke von 25 mA erreicht und für circa 90 Minuten gehalten wurde, bis die blaue Leitbande aus dem Gel gelaufen war.

3.2.5 Immunoblot der aufgetrennten Proteine

Für den immunologischen Nachweis der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran immobilisiert (Towbin et al. 1979). Auf der

Oberfläche von derartigen Membranen sind die Proteine den Reagenzien frei zugänglich und dabei doch örtlich fixiert. Zum Transfer der Proteine wurden vertikale Tank-Transfer-Systeme (Biometra, Bio-Rad) benutzt. Der Elektrotransfer erfolgte für 90 Minuten bei 300 mA.

3.2.6 Proteinnachweis durch Immunodetektion

Die hier verwendete indirekte Methode des Proteinnachweises beruht auf spezifischen Wechselwirkungen von primären, polyklonalen proteinspezifischen Antikörpern (AK) mit markierten, gegen den Primär -Antikörper gerichteten sekundären Antikörpern (Bruckner-Tuderman et al. 1995).

Der Nachweis der Vollform von Kollagen XVII in den Extrakten wurde mit primären, polyklonalen Antikörpern gegen die Kollagen XVII -Endodomäne (Endo-2) durchgeführt, um exklusiv die Vollform und nicht zusätzlich auch noch die 120 kDa schwere Kollagen XVII -Ektodomäne nachzuweisen.

Als zusätzliche Bezugsgröße der Kollagen XVII -Expression wurden die auf Nitrozellulose transferierten Extraktproteine auf ihre γ -Tubulin -Expression untersucht. γ -Tubulin hat ein Molekulargewicht von 48 kDa. Es ist als Baustein der Mikrotubuli in jeder Zelle enthalten und wird konstitutiv in konstanten Maß produziert. Somit diente es als allgemeines Maß für die Zellproteinproduktion bei der Western Blot -Analyse und als Bezugsgröße für die Kollagen XVII -Expression. Zum Einsatz kam hier der primäre Antikörper Anti- γ -Tubulin.

Die freigesetzte Kollagen XVII-Ektodomäne in den Zellkulturmedien wurde nach Methanol-Fällung ebenfalls durch Western Blot -Analyse nachgewiesen. Eingesetzt wurden dabei primäre NC16A-Domänenspezifische Antikörper, die gegen die extrazellulär gelegene NC16A-Region (Aminosäuren 490-566 des Kollagen XVII-Moleküls) gerichtet sind. Die Quantifizierung der Ektodomänen im Medium wurde wieder über Bezugsetzung zur γ -Tubulin-Expression vollzogen.

Der Sekundär-Antikörper kann zur abschließenden Kenntlichmachung mit einem Enzym, einem fluoreszierenden Farbstoff oder einem Metall konjugiert sein (Liddel et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde erstere Methode mit Enzym -gekoppelten Antikörpern gewählt. Das konjugierte Enzym, in diesem Fall Alkalische Phosphatase, setzt ein zugegebenes Substrat entweder zu einem farbigen Niederschlag um oder katalysiert eine chemilumineszente Reaktion.

Vor Überschichtung der Nitrozellulosemembran mit den primären und sekundären Antikörper-Lösungen wurden deren unspezifische Bindungskapazitäten durch eine 30 -minütige Inkubation mit Milchproteinen (TBS mit 2% Magermilchpulver) auf einer Schüttelplattform bei Raumtemperatur abgesättigt. Dann wurde die Milch-Pufferlösung vollständig entfernt und der primäre Antikörper in TBS mit 2% Magermilch hinzu gegeben. Es folgte die Inkubation der Membran über Nacht auf einer Schüttelplattform bei +4°C im Kühlschrank. Am nächsten Morgen schlossen sich fünf Waschschriffe im Blockierungspuffer TBS für jeweils vier Minuten an. Nach dem letzten Abgießen der Waschlösung erfolgte die Überführung in die Schale mit dem sekundären Antikörper, der ebenfalls in TBS und 2% Magermilch gelöst vorlag. Die Inkubationszeit hierin betrug 60 Minuten. Anschließend wurde die Membran zweimal vier Minuten in TBS gewaschen und dann die Detektionsreaktion ausgeführt. Zum Einsatz kamen sekundäre, Alkalische Phosphatase (AP) -gekoppelte Antikörper. Die Immunodetektion beruht auf einer durch AP katalysierten Umsetzung von NBT und BCIP zu einem violetten Produkt. Die Membran wurde erst in P3 -Puffer gewaschen und dann mit Färbelösung überschichtet. Die Färbelösung bestand aus 66 µl NBT- und 33 µl BCIP -Stammlösung in 10 ml P3 -Puffer. Die Membran wurde solange darin inkubiert, bis die detektierten Proteinbanden gut als braune Anfärbungen auf der Nitrozellulose sichtbar waren. Es zeigten sich Banden bei 180 kDa (Vollform Kollagen XVII), 120 kDa (gescheddete Ektodomäne) und bei 48 kDa (γ -Tubulin). Dann wurde die Reaktion durch Umtransferieren in destilliertes Wasser abgebrochen und die Membran danach trocken und dunkel gelagert.

Zur Auswertung wurden die Nitrozellulosestreifen digitalisiert und die Proteinbanden über die Ermittlung der Flächenintegrale densitometrisch ausgewertet. Die erhaltenen Werte der Kollagen XVII-Expression und der freigesetzten Ektodomäne wurden dann durch Division mit den γ -Tubulin-Banden- Flächenintegralen ins Verhältnis gesetzt.

3.3 RNA-Analyse

3.3.1 Isolierung der mRNA aus einer Keratinozyten -Kultur

Um die Expression von Kollagen XVII, seiner Sheddase TACE und dessen physiologischem Hauptinhibitor TIMP-3 in den Keratinozyten auf mRNA -Ebene zu ermitteln, wurde die mRNA der angezüchteten NHK-Zellen wie folgt isoliert.

Als Ausgangsmaterial diente je Proband eine konfluente Keratinozytenkultur in einer 25 cm² -Kulturflasche.

Auch die RNA -Extraktion benötigte insgesamt 2,5 Tage Vorlaufzeit, in der die Zellen mit Ascorbat inkubiert wurden. 48 Stunden vor der Extraktion wurden die Zellen durch Zugabe von Ascorbat (5 mg pro ml H₂O) zur Bildung von Kollagen stimuliert. Dazu wurden pro 25 cm² -Flasche je 7,5 ml Keratinozyten-Medium mit allen Zusätzen (1% AA, EGF, BPE) und zusätzlich 75 µl Ascorbat (Stocklösung 10 µl/ ml) beigegeben. Dann wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und einmal mit PBS gespült. Nun folgte die Shedding-Assay: Zugabe von 5 ml Mangelmedium (1% AA, EGF, ohne BPE) mit 50 µl Ascorbat (5 mg pro ml H₂O) und fünf Stunden Inkubation bei +37°C im Brutschrank. Das Medium wurde abgesaugt und wie das in Kapitel 3.2.1 beschriebene Mangelmedium der Proteinextraktion versorgt. Die Zellen wurden nach Abnahme des Mediums zweimal mit PBS gewaschen, durch Trypsinisierung vom Flaschenboden gelöst und abzentrifugiert (siehe Kapitel 3.2.1).

Dann folgte die Aufreinigung der totalen RNA-Fraktion mit dem „QIAamp RNA Blood Mini Kit“ gemäß Handbuch. Anschließend wurde die enthaltene RNA -Konzentration photometrisch bestimmt. Eine typische Säugerzelle enthält etwa 10-30 pg Gesamt-RNA, wovon jedoch nur etwa 1 - 1,5% auf mRNA fallen. Die mRNA -Menge spaltet sich in bis zu 30.000 verschiedene Arten auf, von denen einige nur noch in sehr geringer Kopienzahl vorliegen. Daher ist eine hohe Effektivität der RNA -Isolation wichtig, damit der gesuchte mRNA -Typ am Ende mit hoher Wahrscheinlichkeit vorhanden ist.

3.3.2 Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt. Die Purin- und Pyrimidinbasen der Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA erfolgt durch Bestimmung der Extinktion in diesem Wellenlängenbereich. Eine optische Dichte (OD) entspricht hierbei 33 µg/ ml einzelsträngiger RNA, bzw. 40 µg/ ml einzelsträngiger DNA oder 50 µg/ ml doppelsträngiger DNA (hyperchromatischer Effekt). Zur Reinheitsbestimmung der gewonnenen Nukleinsäuren bezieht man das Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren von Proteinen, welches bei 280 nm liegt, mit ein. Der Quotient OD_{260} / OD_{280} gibt somit einen relativen Wert für die Reinheit der Proben an. Der Wert einer reinen RNA-Lösung beträgt 2,0 (einer reinen DNA-Lösung 1,8). Ist die Nukleinsäurelösung mit Protein kontaminiert ist der Wert signifikant kleiner (circa 1,5 bei 50 %iger Protein/ DNA-Lösung).

3.3.3 RT-PCR

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, einer RNA -abhängigen DNA-Polymerase aus Retroviren, ist es möglich, DNA -Kopien von mRNA -Matrizen herzustellen. Diese *komplementäre DNA* (cDNA), welche nur die kodierten Sequenzen der genomischen DNA enthält (Taylor et al. 1976), kann dann ihrerseits als Template in Polymerase-Ketten-Reaktionen mit DNA-abhängigen DNA-Polymerasen eingesetzt werden. Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) können geringe Mengen spezifischer DNA-Fragmente mittels geeigneter Primer und einer hitzestabilen Polymerase effizient vervielfältigt werden (Saiki et al. 1988). Template für die RT-PCR war mRNA, von der je Probe 100 ng eingesetzt wurde. Die Mischungen wurden gemäß dem „Titan One-step RT-PCR Kit“ -Handbuch wie in Tabelle 3 angegeben zusammen pipettiert.

Tabelle 3: Pipettierschema für die RT-PCR

Mastermix 1:	µl	Mastermix 2:	µl
Template-RNA (X= 100 ng)	X	5 -fach Puffer	10
Primer-foreward 10 µM	1	dNTP-freies Wasser	14
Primer-reversed 10 µM	1	Enzym-Mix	1
dNTP	4		
DTT Lösung	2,5		
Wasser ad iniection	Y		
RNAse Inhibitor	0,3		
	25 µl total		25 µl total

Nach Vereinigung und Durchmischung beider Ansätze auf Eis im sogenannten Kalt-Start-Verfahren wurde die RT-PCR in einem Schritt in einem Thermocycler durchgeführt. Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit unabhängige Doppelansätze für jede Probe durchgeführt. Die PCR-Bedingungen sind im Folgenden aufgeführt, wobei die Annealing-Temperaturen der verwendeten Primerpaare experimentell bestimmt wurden. Die Amplifikation erfolgte in 31 Zyklen. Die komplette RT-PCR dauerte circa 100 Minuten.

RT-Reaktion:	50°C	30 min
PCR:		
Denaturation	94°C	2 min
31 Zyklen:		
Denaturation:	94°C	30 sec
Annealing:	60°C	30 sec
Extention:	68°C	45 sec
Elongation	68°C	10 min
Abkühlung	4°C	

Die verwendeten Primer, aufgelistet in Tabelle 4, wurden bei Biomers.net GmbH Ulm/ Deutschland, hergestellt und die Spezifität durch Sequenzierung aller Amplifikate verifiziert. Der Primer für Kollagen XVII liegt im 5'-Bereich auf der mRNA, also im N-terminalen Bereich des Typ II-orientierten Transmembranmoleküls und kodiert so die Endodomäne von Kollagen XVII. Der ADAM-17-Primer liegt im 3'-Bereich von TACE, also näher am C-Terminus des Typ I-orientierten Transmembranproteins und kodiert so die Endodomäne von TACE. Die restlichen

Primer für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), TIMP-3, tPA und uPA liegen relativ mittig in der kodierten Region der jeweiligen Proteine.

Die entstandenen DNA -Fragmente wurden im Anschluss für Kollagen XVII, TACE, TIMP-3 und GAPDH, bzw. für tPA und uPA, gelelektrophoretisch aufgetrennt und densitometrisch ausgewertet.

Die Amplifikate der GAPDH wurden dabei als Bezugspunkt für die Zellzahl eingesetzt, da GAPDH ubiquitär in jeder Zelle im gleichen Maß konstitutiv exprimiert wird. GAPDH ist an der Glykolyse beteiligt, einem Teil des Glucose-Katabolismus der Zelle. Dieser Abbauweg der Kohlenhydrate im Rahmen des Stoffwechsels findet im Cytosol der Zellen statt. GAPDH ist ein Enzym dieses Abbaus und oxidiert mit einem Coenzym die Carbonyl-Gruppe zur Carboxyl-Gruppe, d.h. den Übergang vom Zucker(-Phosphat) zum Carbonsäure(-Phosphat).

Tabelle 4 : Auflistung der Primer, die in der vorliegenden Arbeit Verwendung fanden.

Ziel-molekül	Bezeichnung	Fragment gröÙe	Region	Sequenz	Annealing-Temp
Kollagen XVII	Endo-2_Screen F		1203-1224	5'-cag cgg gaa ggt ctt tac agc c-3'	60°C
	Endo-2_Screen R	302 bp	1505-1486	5'-cac ttc cac cag ctg cag ca-3'	60°C
ADAM-17 (TACE)	TACE-HIN-F		2132-2153	5'-gac cag ctg agc atc aat act t-3'	60°C
	TACE-HIN-R	352 bp	2484-2463	5'-tcg tcc ata tgt gag tct gtg c-3'	60°C
TIMP-3	TIMP3KZ-F		1381-1404	5'-aag cag atg aag atg tac cga ggc-3'	60°C
	TIMP3KZ-R	326 bp	1707-1686	5'-acc gaa att gga gag cat gtc g-3'	60°C
GAPDH	h-GAPDH-F		445-467	5'-gga gcc aaa agg gtc atc atc tc-3'	62°C
	h-GAPDH-R	185 bp	629-607	5'-gtc atg agt cct tcc acg ata cc-3'	62°C
tPA	tPA-F		1381-1404	5'-ggc tgt gga cag aag gat gt-3'	60°C
	tPA-R	234 bp	1707-1686	5'-tgc act ctt ccc tct cct gt-3'	60°C
uPA	uPA-F		1707-1686	5'-agg ctc tgc aca gat gga tt-3'	62°C
	uPA-R	197 bp	1707-1686	5'-atg ccc tgc cct ttt taa ct-3'	62°C

3.3.4 Agarosegel -Elektrophorese zur Auftrennung der cDNA-Fragmente

Die elektrophoretische Auftrennung der im vorherigen Schritt produzierten Nukleinsäuren basierte auf der negativen Ladung ihres Zucker-Phosphat-Rückrats, wodurch sie in einem elektrischen Feld in Richtung Anode wanderten. Die Beweglichkeit eines doppelsträngigen Fragments ist in etwa umgekehrt proportional zum Logarithmus seiner Größe (Helling et al. 1974). Durch Einsatz eines geeigneten kommerziell erhältlichen Proteinmarkers am Rand der Proben lässt sich die Größe der aufgetrennten Fragmente leicht bestimmen. Die Visualisierung erfolgte durch Ethidiumbromid, das in den DNA-Doppelstrang interkaliert und bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 260 nm zu orangefarbener Fluoreszenz angeregt wird. Da DNA-Fragmente der Größe 180-350 bp erwartet wurden benutzte man ein 1% -iges Agarosegel, das mit TBE -Puffer unter Zugabe von 0,01% Ethidiumbromid hergestellt wurde.

8 µl der PCR -Produkte wurden mit jeweils 1,5 µl Schwerepuffer versetzt, als Größenmarker wurde eine „100 bp Oligonukleotid -Leiter“ verwendet. Die Gele liefen 30 Minuten bei einer Spannung von 120V.

Danach wurden die Gele mit einem Photodokumentationssystem bei 260 nm abphotographiert und als Bild abgespeichert. So konnten später alle Bilder gleichzeitig mit Hilfe des Computerprogramms „Gel -Pro Analyzer“ der Firma Media Cybernetics, Silver Spring (USA), densitometrisch bearbeitet und ausgewertet werden.

3.4 Statistik

Die Versuchsergebnisse sind als Medianwerte mit Variationsbreite (R) angegeben, wobei n die Anzahl der jeweils eingesetzten Proben wiedergibt. Die Überprüfung der Daten auf Normalverteilung (mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test für kontinuierliche Variable und dem Chi-Quadrat-Test für diskrete Variable) ergab zum Teil nicht-normalverteilte Stichproben. Deshalb wurde zur Prüfung der Signifikanz der nicht-parametrische zweiseitige Mann-Whitney-U-Test für ungepaarte Stichproben angewandt. Ein Ereignis mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $< 5\%$ ($p < 0,05$) wurde als signifikant betrachtet. Signifikante Differenzen sind im Text erwähnt und in den Abbildungen gekennzeichnet.

Kapitel 4

Ergebnisse

Für diese Studie konnten Hautproben von 38 humanen Probanden gewonnen werden. Die Versuchsgruppe der jungen Probanden war ausschließlich männlich und im Median (Variationsbreite) 3 Jahre (1-12) alt. Die Gruppe der alten Probanden war im Median (Variationsbreite) 67 Jahre (51-92) alt, wobei die 6 Frauen mit im Median 73 Jahren (56-92) deutlich, aber nicht signifikant, älter waren als die 17 Männer mit im Median 66 Jahren (51-90).

4.1 Immundetektion der Vollform von Kollagen XVII und seiner löslichen Ektodomäne

Kollagen XVII existiert in zwei Formen: als membrangebundenes, Typ II orientiertes Transmembrankollagen mit einem Molekulargewicht von 180 kDa und als lösliche 120 kDa schwere Ektodomäne. Die lösliche Ektodomäne wird durch Proteolyse von der Zelloberfläche freigesetzt und besteht aus 15 unterschiedlich großen Kollagendomänen, die von nicht -kollagenen Sequenzen unterbrochen werden. Der Nachweis beider Formen erfolgte durch Western Blot –Analyse.

Für die Western Blot -Analyse der Keratinozytenextrakte wurden normalisierte Volumina mit jeweils 20 µg Gesamtprotein -Anteil verwendet. Nach der Auftrennung auf einem 7 %igen SDS-Gel wurden die Proben auf Nitrocellulose übertragen und mit Hilfe von domänenspezifischen Kollagen XVII -Antikörpern visualisiert. Abbildung 4 zeigt einen repräsentativen Immunoblot von Zellextrakten und Zellkulturmedien der NHK-Zellen.

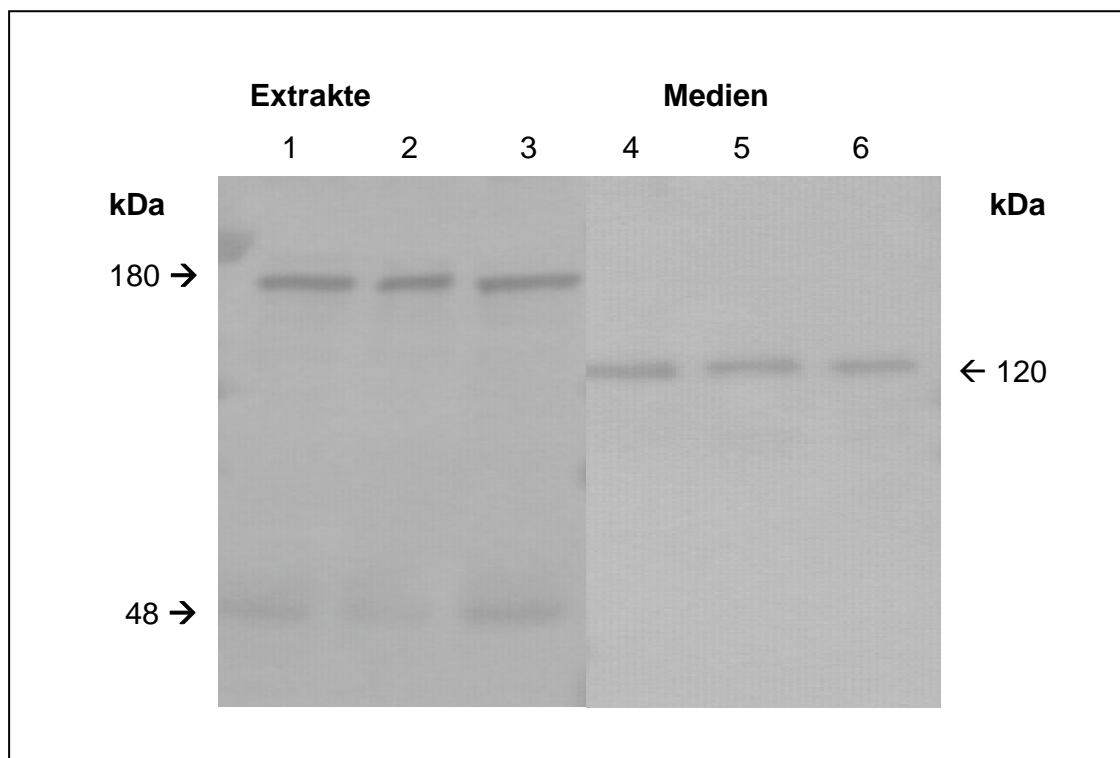


Abbildung 4: Western Blot -Analyse von Zell-Extrakten und konzentrierten Zellkulturmedien aus humanen Keratinozyten.

Zellextrakte: Reihe 1-3 zeigt einen Western-Blot mit NHK-Zellextrakten, der einer Immundetektion mit Endo-2- und γ -Tubulin-Antiserum unterzogen wurde. Es treten je Bahn zwei deutliche Banden auf. Die obere Bande auf Höhe 180 kDa ist Kollagen XVII und die untere Bande liegt bei 48 kDa und entspricht γ -Tubulin.

Zellkulturmedien: In Reihe 4-6 wurden die Proteine aus dem Zellkulturmedium mit NC16A-Antikörpern inkubiert. Die Banden auf der Höhe von 120 kDa entsprechen der gelösten Ektodomäne von Kollagen XVII.

Von den insgesamt für diese Studie zur Verfügung stehenden 38 Hautproben wurden bei 14 jungen und 22 alten Proben auswertbare Ergebnisse erzielt. Die Ergebnisse der Proteinextrakte und -medien von 2 Proben wurden aufgrund verwischter Immunoblotbahnen verworfen und kamen in der Proteinanalyse nicht zur Auswertung.

4.1.1 Nachweis der Vollform des Kollagen XVII als Maßstab der Expression

Die Nitrozellulosestreifen der Extrakte aus der Western-Blot-Analyse wurden digitalisiert und die Proteinbanden über die Ermittlung der Flächenintegrale densitometrisch ausgewertet. In Tabelle 5 und Abbildung 5 sind die so erhaltenen Relativwerte der Kollagen XVII -Expression dargestellt. Für die Kollagen XVII -Expression zwischen der jungen und der alten Versuchsgruppe ergaben sich keine

signifikanten Unterschiede. Auch im Vergleich der Expression von Männern zu Frauen wurden keine Differenzen ermittelt.

Tabelle 5: Nachweis der Vollform des Kollagen XVII.

Eingesetzte Zellextrakte, n=36	Kollagen XVII -Expression	
	Median	R
NHK der jungen Versuchsguppe, n=14	6,57	3,10-13,02
NHK der gesamten alten Versuchsguppe, n= 22	6,72	3,75-15,20
NHK der alten männlichen Teilgruppe, n=16	6,72	3,75-15,20
NHK der alten weiblichen Teilgruppe, n=6	6,58	4,82-9,96

Zur Immundetektion wurden die Zellextrakte von insgesamt 36 Probanden untersucht. Die 14 jungen Probanden (Alter <12 Jahren) waren alle männlich, von den 22 alten Probanden (Alter >50 Jahre) waren 16 männlich und 6 weiblich. Die in Spalte 2 dargestellten Medianwerte der Bandenstärken stellen Relativwerte, Kollagen XVII-Bandenstärke dividiert durch die γ -Tubulin-Bandenstärke, dar. Zu jedem Wert wurde die Variationsbreite (R) in Spalte 3 mit angegeben.

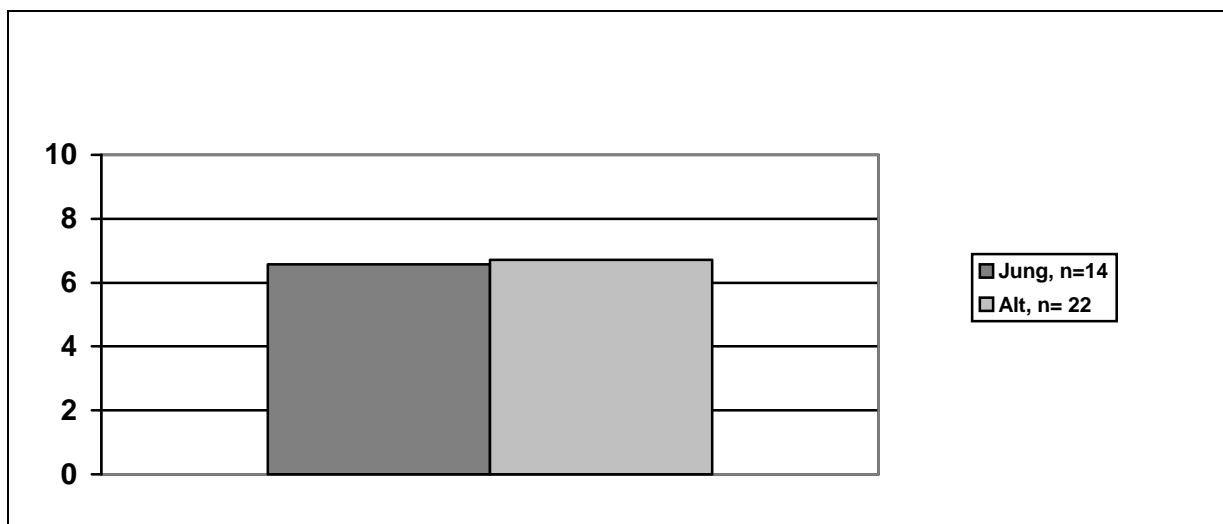


Abbildung 5: Vergleich der Kollagen XVII -Expression in humanen Keratinozyten von jungen und alten Probanden.

Die repräsentative Abbildung der Ergebnisse dieses Versuchsabschnittes zeigt die Mediane der Kollagen XVII -Expression der gesamten jungen und alten Probanden aus Tabelle 5 im Vergleich. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den jungen und alten Keratinozyten ermittelt werden.

4.1.2 Immundetektion der freigesetzten löslichen Kollagen XVII -Ektodomäne im Zellkulturmedium als Nachweis des Sheddings

Die freigesetzte Kollagen XVII-Ektodomäne in den Zellkulturmedien wurde nach Methanol-Fällung ebenfalls durch Western Blot -Analyse nachgewiesen. Zum Einsatz kamen dabei NC16A-Domänenspezifische Antikörper, die gegen die extrazellulär gelegene NC16A-Region (Aminosäuren 490-566 des Kollagen XVII-Moleküls) gerichtet sind. Die Antikörper visualisieren eine Proteinbande bei 120 kDa auf der Nitrozellulose.

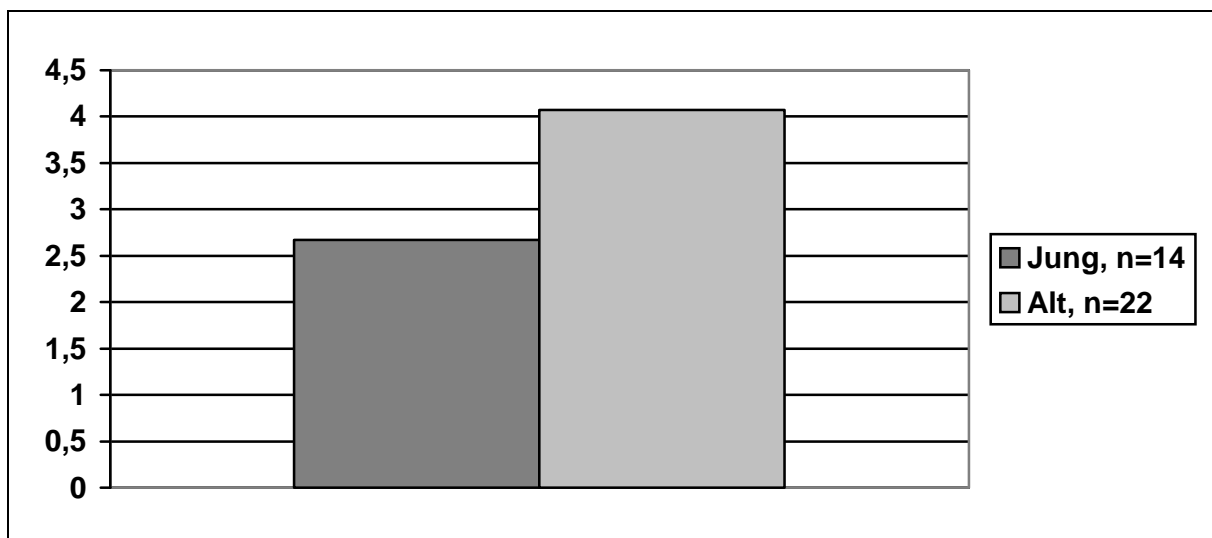
Die Freisetzung der Ektodomäne erfolgt hauptsächlich durch eine ebenfalls membrangebundene Disintegrin-Metalloproteinase, genauer das *TNF- α converting enzyme* (TACE). Das Vorhandensein der Ektodomäne im Medium zeigt daher an, dass die Vollform des Kollagen XVII prozessiert „geshedded“ wurde. Vermindertes oder vermehrtes Auffinden der Ektodomäne im Medium ist also ein indirektes Maß für die Prozessierungsrate von Kollagen XVII. Die Quantifizierung der Ektodomänen im Medium wurde wiederum densitometrisch durchgeführt, wobei die ermittelten Werte mit den zuvor ermittelten Werten der γ -Tubulin -Expression ins Verhältnis gesetzt wurden. Tabelle 6 zeigt eine Aufstellung aller ermittelten Werte.

Bei den Keratinozyten der älteren Probanden konnte ein signifikant ($p < 0,05$) erhöhtes Auftreten der Ektodomänen im Medium nachgewiesen werden (Abbildung 6). Hierbei stellte sich auch heraus, dass die Keratinozyten der weiblichen Probanden im Vergleich zu den Keratinozyten der Männer signifikant mehr shedden (Abbildung 7, $p < 0,01$).

Tabelle 6: Nachweis der Kollagen XVII -Ektodomäne im Medium.

Eingesetzte Medien, n=36	Ektodomäne im Medium	
	Median	R
Gesamte junge Versuchsgruppe, n=14	2,67	1,03-6,93
Gesamte alte Versuchsgruppe, n=22	4,07	1,67-6,78
Teilgruppe der alten Männer, n=16	3,80	1,67-6,78
Teilgruppe der alten Frauen, n=6	5,59	4,82-5,81

Zur Immundetektion wurden insgesamt Keratinozytenmedien von 36 Probanden untersucht. Die 14 jungen Probanden (Alter <12 Jahren) waren alle männlich, von den 22 alten Probanden (Alter >50 Jahre) waren 16 männlich und 6 weiblich. Spalte 2 zeigt die Mediane der detektierten Ektodomäne im Medium. Es sind Relativwerte, berechnet aus den densitometrisch bestimmten Werten der Ektodomäne dividiert durch die Werte von γ -Tubulin der gleichlang belichteten Extrakt -Nitrozellulose. Zu jedem Medianwert wurde die Variationsbreite (R) berechnet.

**Abbildung 6: Nachweis der Kollagen XVII-Ektodomäne im Zellkulturmedium.**

Die Abbildung zeigt die Medianwerte des Ektodomänen-Sheddings der Keratinozyten der gesamten jungen und alten Probanden aus Tabelle 5. Beim Vergleich der jungen mit der alten Versuchsgruppe wird ein signifikant ($p < 0,05$) vermehrtes Shedding bei den Keratinozyten der Älteren beobachtet.

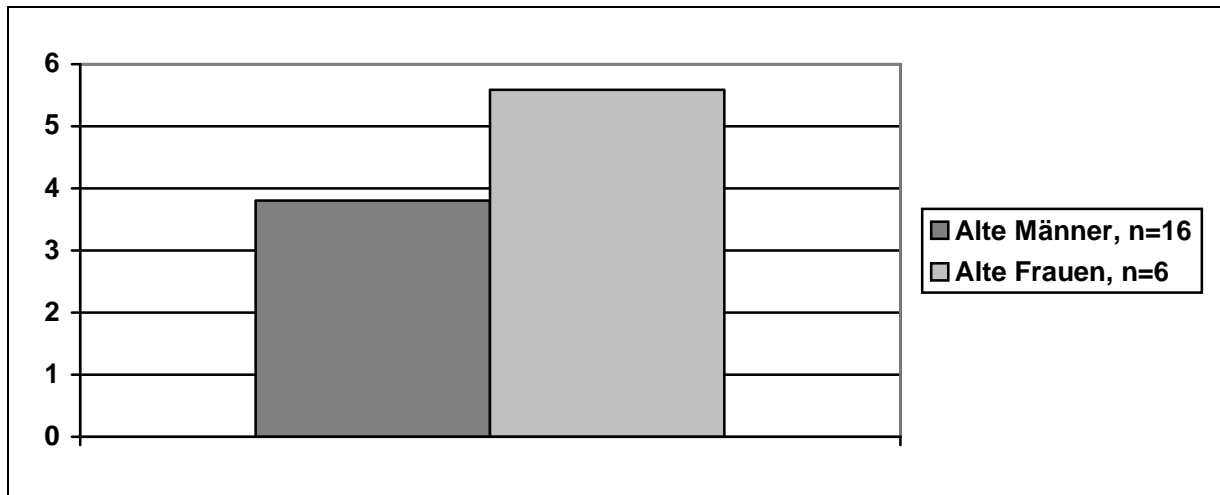


Abbildung 7: Vergleich des Ektodomänen-Sheddings von Keratinozyten alter Männer zu Keratinozyten alter Frauen.

Die Abbildung zeigt die Medianwerte des Ektodomänen-Sheddings der Keratinozyten der alten Probanden aus Tabelle 5 im Geschlechtervergleich. Beim Vergleich zeigt die weibliche Versuchsgruppe signifikant ($p < 0,01$) vermehrtes Shedding.

4.2. Nachweis der mRNA-Expression

4.2.1 RT-PCR-Nachweis der Vollform des Kollagen XVII, seiner Protease TACE und deren Inhibitor TIMP-3

Von jeder Probe wurden 100 ng totale RNA für die RT-PCR Reaktion eingesetzt. Die entstandenen DNA -Fragmente wurden für Kollagen XVII, TACE, TIMP-3 und die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gelelektrophoretisch aufgetrennt und densitometrisch ausgewertet. Alle der Studie zur Verfügung gestellten 38 Hautproben konnten auf mRNA-Ebene ausgewertet werden. Abbildung 8 zeigt ein repräsentatives Gel.

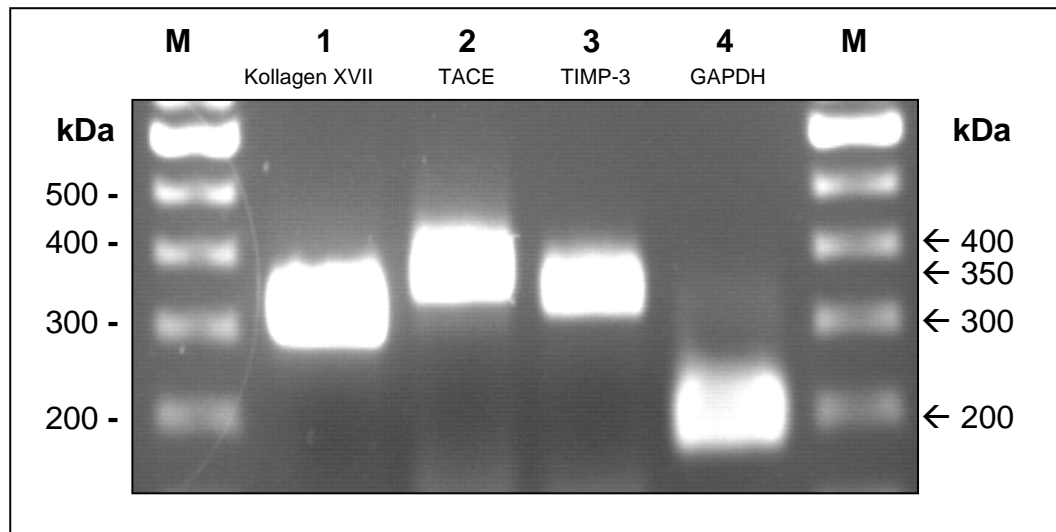


Abbildung 8: Repräsentatives Bild eines Agarosegels mit den spezifischen DNA-Amplifikaten.

M: 100-bp-DNA-Marker, **Bahn 1:** Kollagen XVII, **Bahn 2:** TACE, **Bahn 3:** TIMP-3, **Bahn 4:** GAPDH. Jeweils 8 µl des PCR-Ansatzes wurde auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Die einzelnen Signale wurden densitometrisch ausgewertet.

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse aller mRNA -Expressionen dargestellt. Die densitometrische Auswertung der Ergebnisse konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kollagen XVII-Expression der jungen und der alten Versuchsgruppe aufzeigen. Auch ein Vergleich alter Männer zu alten Frauen ergab keinen signifikanten Unterschied.

Die mRNA-Expressionen von TACE und dem Inhibitor TIMP-3 zeigten ebenfalls keine altersabhängigen Unterschiede. Bei der Ermittlung dieser Expressionen zeigte sich jedoch eine sehr starke individuelle Streuung bei den ermittelten Werten, so dass der Probenumfang für eine abschließende Aussage möglicherweise zu klein war.

Tabelle 7: Relative Expression von Kollagen XVII, TACE und TIMP-3 in Keratinozyten aller Probanden.

Eingesetzte RNA-Proben	Kollagen XVII		TACE		TIMP-3	
	Median	R	Median	R	Median	R
Junge Versuchsgruppe, n=15	1,39	0,75-2,03	0,89	0,06-1,64	0,78	0,04-1,42
Alte Versuchsgruppe gesamt, n=23	1,60	1,02-4,32	0,55	0,00-3,23	0,19	0,00-3,89
Teilgruppe der alten Männer, n=17	1,60	1,03-4,32	0,42	0,00-3,23	0,13	0,00-3,89
Teilgruppe der alten Frauen, n=6	1,90	1,02-2,51	0,79	0,10-1,09	0,76	0,18-1,71

Zur RT-PCR wurden insgesamt 38 Proben eingesetzt. Die 15 jungen Probanden (Alter <12 Jahren) waren alle männlich, von den 23 alten Probanden (Alter >50 Jahre) waren 17 männlich und 6 weiblich. Die dargestellten Medianwerte der Bandenstärken der jeweiligen Amplifikate sind Relativwerte, berechnet aus den densitometrisch ausgewerteten Banden von Endo-2-/ TACE-/ TIMP-3- dividiert durch die GAPDH-Bande. Zu jedem Median wurde die Variationsbreite (R) ermittelt.

4.2.2 Nachweis der mRNA -Expression von den Plasminogenaktivatoren tPA und uPA

Da eine Plasminaktivierung zu einer verstärkten Produktion der Kollagen XVII-Ektodomäne (die C-terminal trunkierte 97 kDa-Form) führen kann, wurden in einem zusätzlichen Ansatz alle Proben der männlichen Probanden auf die Expression der beiden Plasminogenaktivatoren (PA), dem „*Urokinase-type*“ (uPA), bzw. dem „*Tissue-type*“ (tPA), studiert (aus Kostengründen konnten die weiblichen Proben nicht untersucht werden). Je Durchlauf wurden auch wieder 100 ng totale RNA als Ausgangsprobe und die GAPDH -Expression als Bezugsgröße eingesetzt. Abbildung 10 zeigt ein repräsentatives Gel der Amplifikate nach RT-PCR.

Hierbei konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der uPA-Expression der jungen und der alten Männer ($p < 0,05$) festgestellt werden. Die Medianwerte dazu fasst Tabelle 8 zusammen. Diese erhöhte uPA -Expression bei der älteren Gruppe ist in Abbildung 11 bildlich dargestellt. Auch bei der Ermittlung dieser Expressionswerte

zeigten sich wieder starke individuelle Schwankungen, was an den großen Variationsbreiten ersichtlich wird.

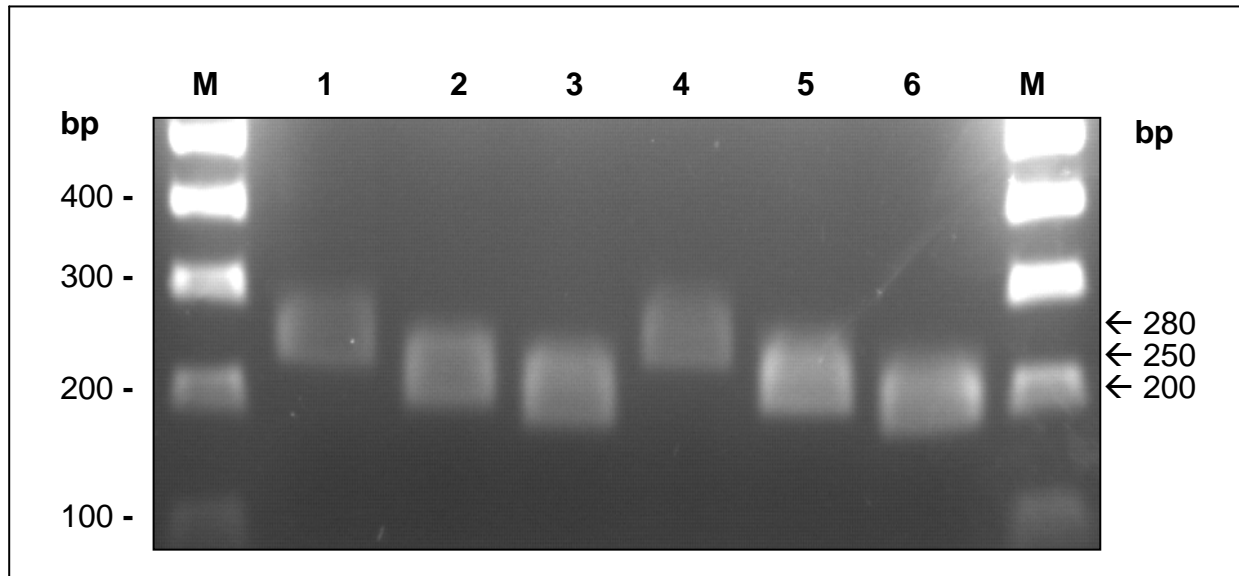


Abbildung 9: Repräsentatives Agarosegel der Amplifikate für die Plasminogenaktivatoren.

M: 100-bp-DNA-Marker, **Bahn 1+4:** tPA, **Bahn 2+5:** uPA, **Bahn 3+6:** GAPDH. Jeweils 8 µl pro RT-PCR-Reaktion wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Aufgetragen sieht man links (Bahn 1-3) die DNA-Amplifikate aus der RNA eines jungen, rechts (Bahn 4-6) aus der RNA eines alten Probanden. Die Gele wurden photographiert, digitalisiert und die Banden densitometrisch ausgewertet. Die Flächenintegrale der tPA- und uPA-Werte wurden mit denen für die GAPDH ins Verhältnis gesetzt. Auf diesem Gel wird bei beiden Probanden tPA deutlich schwächer exprimiert als uPA. Auffallend ist die deutlich stärkere uPA -Expression beim älteren Probanden (Bahn 5) im Vergleich zu dem jüngeren (Bahn 2).

Tabelle 8: Nachweis der tPA- und uPA-Expression.

RNA-Proben n=32	Tissue-type Plasminogenaktivator		Urokinase-type Plasminogenaktivator	
	Median	R	Median	R
Junge Probanden, n=15	0,02	0,00-0,53	0,77	0,31-1,14
Alte Probanden, n=17	0,00	0,00-0,45	0,94	0,18-2,01

Zur Ermittlung der Expressionswerte durch RT-PCR wurden insgesamt 32 männliche Personen untersucht, 15 junge Probanden (Alter <12 Jahren) und 17 alte Probanden (Alter >50 Jahre). Die dargestellten Werte stellen Medianwerte der tPA- und uPA-Signale im Verhältnis zum GAPDH-Signal dar. Zu jedem Wert wurde die Variationsbreite (R) mit angegeben.

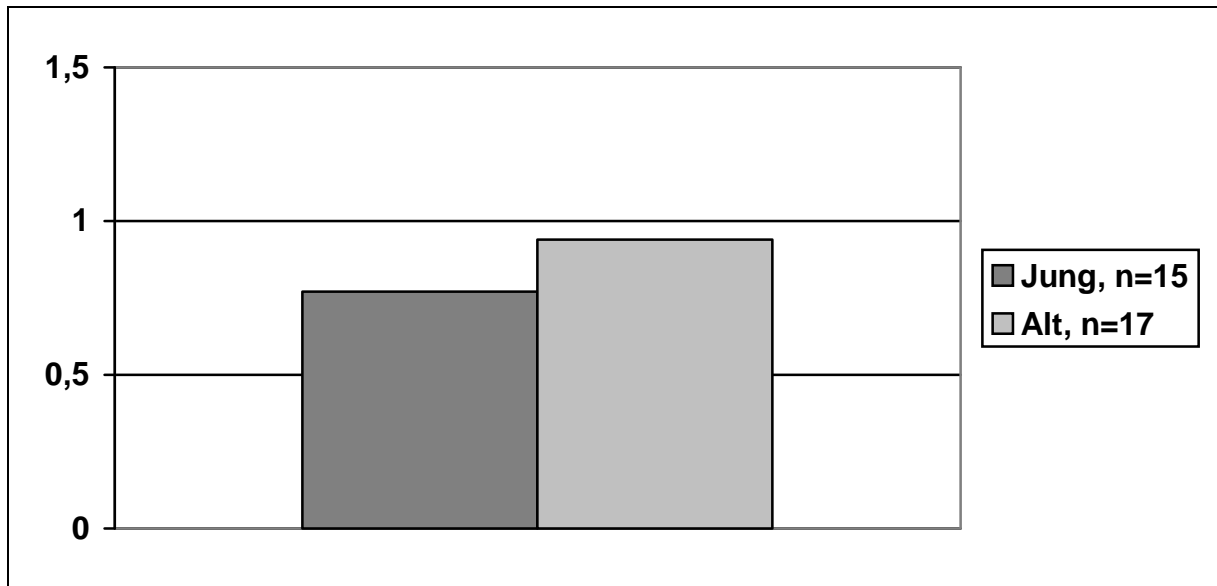


Abbildung 10: Nachweis der Urokinase-type Plasminogenaktivatoren -Expression.

Die Abbildung zeigt die Mediane der uPA -Expression der jungen und alten Probanden aus Tabelle 3 im Vergleich. Die ältere Versuchsgruppe zeigt eine signifikant erhöhte uPA -Expression im Vergleich zu den jüngeren Probanden ($p < 0,05$).

Kapitel 5

Diskussion

5.1 Kollagen XVII -Expression im Alter

Kollagen XVII spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Struktur von Hemidesmosomen (Zillikens et al. 1999; Franzke et al. 2003) und damit bei der dermoepidermalen Haftung. Da die Blasenbildung beim Bullösen Pemphigoid auf der Bildung von hochaffinen Autoantikörpern gegen Kollagen XVII beruht, wurde eine eventuell erhöhte Kollagen-XVII-Expression im Alter vermutet. Diese Erhöhung bei älteren Menschen könnte Veränderungen in der Biologie des Kollagen XVII verursachen oder gar das Erreichen des Hypersensibilisierungs-Schwellenwertes ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit konnten in den Keratinozyten jedoch keine signifikanten Unterschiede der Kollagen XVII-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene nachgewiesen werden. Alte wie auch junge Keratinozyten exprimierten ähnliche Mengen an Kollagen XVII. Kein Unterschied wurde auch im Geschlechtervergleich nachgewiesen. Die in dieser Arbeit gesammelten Daten sprechen somit dafür, dass altersabhängige Expressionsunterschiede des Kollagen XVII nicht zu der Entstehung des Bullösen Pemphigoids beitragen.

5.2 Vermehrtes Shedding von Kollagen VXII im Alter

Kollagen XVII existiert in zwei Formen: als Vollform, bestehend aus drei α -Ketten von 180 kDa, und als lösliche Ektodomäne aus drei α -Ketten der Größe von 120 kDa (Hirako et al. 1998; Schacke et al. 1998). Beide Formen sind in Hautextrakten nachgewiesen worden (Schacke et al. 1998). Die Blasenbildung beim Bullösen Pemphigoid ist dabei Folge der Bildung hochaffiner Autoantikörper gegen zwei Strukturproteine von Hemidesmosomen, das intrazelluläre Plaqueprotein BP-230 und das BP-180 (Kollagen XVII), wobei Kollagen XVII vermutlich als Hauptautoantigen

fungiert. Dieses konnte auch in einem Mausmodell des Bullösen Pemphigoids nachgewiesen werden, in dem Blasenbildung nach subkutaner Injektion von Kollagen XVII-Antikörpern induziert werden konnte (Liu et al. 1993). Die im Zusammenhang mit der Erkrankung des Bullösen Pemphigoids auftretenden gewebsgebundenen und zirkulierenden IgG-Autoantikörper sind dabei hauptsächlich gegen Epitope innerhalb der NC16A-Region und in 30% gegen den C-Terminus der Ektodomäne gerichtet. Wie Zillikens et al. (1997) belegen konnte, binden die IgG-Autoantikörper dabei an vier bestimmte Epitope der 45 Aminosäuren in dem N-terminal gelegenen Ende der NC16A -Domäne. Die 31 Aminosäuren am C-terminalen Ende der NC16A -Region spielen dabei wohl keine Rolle (Zillikens et al. 1997). Sowohl die Vollform als auch die abgelöste Ektodomäne wird von zirkulierenden IgG- und IgA -Antikörpern detektiert (Schumann et al. 2000). Zur subepidermalen Blasenbildung ist der Adhäsionsverlust der Keratinozyten von der Basalmembran essentiell. Die alleinige Bindung von Autoantikörpern führt jedoch noch nicht zur Blasenbildung und damit zur Autoimmundermatose. Zusätzlich ist das Einwandern von Entzündungszellen in die Haut und die Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren einschließlich Zytokinen und Proteasen eine zwingende Voraussetzung (Zone et al. 1990; Schumann et al. 2000). Die derzeitige Hypothese ist, dass hierbei die Proteasen aus den rekrutierten Immunzellen wichtig sind, wie z.B. die Plasminogenaktivatoren, die indirekt durch eine Enzymaktivierungskaskade einwirken oder die humane Leukozytenelastase (HLE), die zur direkten Degradation der subepidermalen Adhäsionproteine beiträgt (Liu et al. 2005). An dem Verlust der dermo-epidermalen Adhäsion könnte aber auch das Kollagen XVII -Shedding beteiligt sein, das im normalen Rahmen physiologische Zellprozesse, wie die Zellteilung, die Zellmigration und die Keratinozyten-Differenzierung ermöglicht. Wenn das Shedding jedoch in vermehrtem Umfang auftritt, könnte es an der Entstehung des Bullösen Pemphigoids beteiligt sein. Zum einen könnte dies zur direkten Entstehung der Blasen führen, beispielsweise durch vermehrte Destabilisation der Hemidesmosomen als Folge vermehrten Kollagen XVII -Shedding. Zum anderen und eher wahrscheinlich ist die Annahme, dass das vermehrte Shedding zu einer Akkumulation der Ektodomäne im Körper führt, was eine Überschreitung der Hypersensibilisierungsschwelle und die Auslösung der Autoimmunantwort gegen Kollagen XVII zur Folge hat. Diese Annahme wird auch dadurch erhärtet, dass die

Kollagen XVII-Ektodomäne eine außerordentliche Stabilität gegen Degradation aufweist (Schacke et al. 1998; Franzke et al. 2002).

Die dieser Arbeit unter anderem zu Grunde liegende Frage war darum, ob das Shedding bei alten Probanden vermehrt stattfindet und so eventuell in die Pathologie des Bullösen Pemphigoids involviert ist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Keratinozyten von Probanden >50 Jahren signifikant mehr freie Ektodomänen abgeben (shedden) als Keratinozyten von Probanden <12 Jahren. Dies korreliert mit vielen Literaturangaben, die das BP als Alterskrankheit des Menschen beschreiben. Während die Häufigkeit des Auftretens im Alter <60 Jahren bei 0,6 Fällen pro Million Einwohner und Jahr liegt, erkranken in der Altersklasse >90 Jahren knapp 400 Personen pro Million Einwohner jedes Jahr neu (Jung et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass Keratinozyten von Frauen im Alter >50 Jahren signifikant erhöhtes Kollagen XVII -Shedding aufweisen als Männer im Alter >50 Jahren. Das könnte zum einen an dem Stichprobenumfang der Frauen liegen, der ein um 7,4 Jahre erhöhtes Durchschnittsalter gegenüber den Männern aufweist, was ja die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von BP erhöht oder zum anderen mit einer verstärkten Anfälligkeit älterer Frauen für das Auftreten eines Bullösen Pemphigoids in Zusammenhang stehen. Letztere Annahme wird durch die Ergebnisse von Nanda et al. (Nanda et al. 2004; Nanda et al. 2006) bestärkt. Jedoch sollte erwähnt werden, dass eine andere Studie sogar eine leichte Prävalenz des Bullösen Pemphigoids bei Männern nachgewiesen hat (Jung et al. 1999).

5.3 Die Expression der Sheddase TACE und ihres Inhibitors TIMP-3 ist altersunabhängig

Eingehende zellbiologische und biochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Ektodomäne von Kollagen XVII hauptsächlich durch ADAM-17, auch TACE (*TNF- α converting enzyme*) genannt, freigesetzt wird (Franzke et al. 2002). Ihr physiologischer Hauptinhibitor ist TIMP-3 (*Tissue-inhibitor of metalloproteinases 3*) (Amour et al. 1998).

Die gesteigerte Kollagen XVII-Sheddingrate könnte gegebenenfalls auf Grund einer erhöhten Expression von TACE oder durch eine verringerte Expression seines Hauptinhibitors TIMP-3 ausgelöst werden. Die Daten dieser Studie haben jedoch keine signifikanten altersabhängigen Veränderungen der mRNA -Expression von

TACE oder TIMP-3 nachweisen können. Aus finanziellen (teure Antikörper gegen TACE und TIMP-3) und zeitlichen Gründen konnte leider keine Western Blot - Analyse der Expression auf Proteinebene durchgeführt werden, so dass die Frage, ob das gesteigerte Shedding möglicherweise auf posttranslatorischer Regulation der TACE- oder TIMP-3-Proteine beruht, in dieser Studie nicht beantwortet werden konnte. Diese Möglichkeit ist gerade für TACE nicht unwahrscheinlich, da diese Disintegrin-Metalloprotease als inaktive Proform exprimiert wird und dann durch Furin -Konvertasen aktiviert werden muss (Franzke et al. 2004). Somit könnte eine verstärkte Aktivierung der TACE-Proformen die höhere Sheddingrate in den Keratinozyten der älteren Probanden auslösen. Eine verstärkte Abbaurate (*turnover*) des TIMP-3 -Proteins hätte den gleichen Effekt zur Folge.

Als vorläufiges Ergebnis kann nur festgestellt werden, dass das gesteigerte Shedding der Älteren nicht direkt durch die Expression von TACE oder TIMP-3 auf RNA-Ebene reguliert wird, sondern höchstens auf postranskriptionaler Ebene. Oder es spielen bis jetzt noch unbekannte Enzyme/ Inhibitoren oder Steuerungsvorgänge eine Rolle. Diese Fragen erfordern zu ihrer Klärung weitere Untersuchungen.

5.4 Die Expression der Plasminogenaktivatoren ist nur teilweise altersabhängig

In dieser Studie wurde noch die mRNA-Expression von Plasminogenaktivatoren (PA) mitberücksichtigt, da stark erhöhte Plasmin- und Plasminogenaktivatoren-Spiegel in Blasenflüssigkeit von BP-Patienten beschrieben wurden (Schmidt et al. 2004). Es zeigte sich, dass die Bindung Kollagen XVII-spezifischer Autoantikörper die Freisetzung von tPA aus Keratinozyten induziert, und es damit zu einer verstärkten Plasminaktivierung kommt (Schmidt et al. 2004).

Unser Ansatz sollte die Frage klären, ob erhöhte Plasminogenaktivatoren-Spiegel im Alter auf mRNA -Ebene nachzuweisen sind. Falls das der Fall wäre, könnten sie zu einer Erhöhung von aktiviertem, katalytisch aktivem Plasmin führen und dadurch indirekt zur erhöhten Freisetzung des Antigens LABD97 beitragen. In Pilotversuchen an kultivierten Keratinozyten konnte gezeigt werden, dass Zugabe von Plasmin direkt eine verstärkte Abgabe des LABD97 verursacht und Plasmin somit unter pathologischen Bedingungen potentiell als „Kollagen XVII -Sheddase“ fungieren kann (Franzke, unpublizierte Ergebnisse). Erreicht man dabei den Schwellenwert für die

Hypersensibilisierung, so wäre dies ein weiterer Baustein auf dem Weg zur Ursachenfindung für das Auftreten des Bullösen Pemphigoids.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen keinen signifikanten Unterschied in den Expressionsraten von tPA in den Keratinozyten von jungen und alten männlichen Probanden. Wohl aber zeigen die älteren Männer signifikant erhöhte uPA-Expressionsraten im Vergleich zu den jungen Probanden. Die tissue type-Plasminogenaktivatoren scheinen somit keine Rolle bei der Induktion der erhöhten Kollagen XVII-Sheddingrate zu haben, wohl aber die urokinase type-Plasminogenaktivatoren. Die genauen Abläufe ihrer Wirkung muss in weiteren Studien aufgeklärt werden.

5.5 Ausblick

Die hier erhobenen Befunde eröffnen interessante Aspekte hinsichtlich der Frage der Funktion der Ektodomänenablösung des Kollagen XVII in Keratinozyten. Zukünftige Arbeiten dürften das Wissen zur Pathophysiologie des Bullösen Pemphigoid und zur physiologischen Interaktion der Autoantigene dieser Autoimmunerkrankung mit der dermoepidermalen Junktionszone vermehren. Gerade die Signalwege nach Bindung der Autoantikörper, z.B. die Antikörper-vermittelte Bildung von Entzündungsmediatoren und die Funktionsabläufe der Proteasen, gilt es zu charakterisieren. Wodurch findet im Alter vermehrtes Shedding statt und ist dies in einem erweiterten Probenumfang wirklich abzusichern? Sind postrtranslationale Regulationsmechanismen für TACE oder TIMP-3 für das verstärkte Shedding verantwortlich oder welche zusätzlichen Enzyme sind noch beteiligt? Ist uPA wirklich an der Ausbildung des BP beteiligt und wenn ja auf welche Weise? Zur Klärung dieser und anderer Fragen sind weitere molekularbiologische Arbeiten mit größeren Stichprobenumfängen zu Kollagen XVII und seinen Enzymkaskaden wünschenswert. Auch die Frage, ob bei Tieren wirklich keine Altersdisposition zur Entstehung des BP vorliegt und wenn ja aus welchem Grund, gilt es zu beantworten. Denn jeder Fortschritt zum Verständnis der Entstehung des Bullösen Pemphigoids ermöglicht es, Verbesserungen in der spezifischen Therapie dieser relativ häufigen Autoimmunerkrankung zu entwickeln. Dies könnte besonders bei dem Versuch der Wiederherstellung verstärkter Toleranz gegen Kollagen XVII und damit bei der Verhinderung der Blasenbildung entscheidend sein.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Kollagen XVII ist der am besten studierte Vertreter der Proteingruppe der Transmembran-Kollagene. Dieses membranständige Protein, das ursprünglich als das 180 kDa -Antigen des Bullösen Pemphigoids (BP180) identifiziert wurde, ist Bestandteil der epidermal-dermalen Verknüpfungszone der Haut. Als Komponente der Hemidesmosomen ist sein zytosolischer N-Terminus mit dem Zellskelett verbunden, wogegen sein extrazellulärer Teil in der Basalmembranzzone bindet. Als Homotrimer besteht Kollagen XVII insgesamt aus drei α -Ketten mit einer Molekülmasse von jeweils 180 kDa. Die Ektodomäne von Kollagen XVII besteht aus 15 kollagenen (COL1-COL15) und 16 nicht-kollagenen (NC1-NC16A) Sequenzen. Kollagen XVII wird konstitutiv von der Zelloberfläche gesheddet. Dabei wird der größte Teil der extrazellulären Ektodomäne abgegeben, welcher ein Molekulargewicht von 120 kDa hat. Die Ablösung wird von membrangebundenen Proteinasen der ADAM-Familie katalysiert, welche wiederum zuvor durch Furin aktiviert werden müssen. Der Prototyp der Sheddasen ist ADAM-17, auch TACE genannt, der von seinem physiologischen Inhibitor TIMP-3 reguliert wird. Die physiologische Bedeutung des Sheddings ist noch nicht endgültig geklärt. Vermutet wird die Beteiligung an der Ablösung von Keratinozyten zur Zellteilung, Differenzierung und bei der Migration, z. B. bei der Wundheilung. Kollagen XVII spielt aber auch als Autoantigen eine Rolle. Bei der Autoimmundermatose des Bullösen Pemphigoids treten gewebsgebundene und zirkulierende Autoantikörper gegen Kollagen XVII auf, besonders gegen dessen NC16A-Region der Ektodomäne. Die Bindung von Antikörpern zusammen mit entzündlichen Prozessen führt zum Verlust der dermoepidermalen Haftung und so zur subepidermalen Blasenbildung.

Der Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Frage, ob es im Alter zu einer verstärkten Expression von Kollagen XVII, beziehungsweise zu vermehrtem Shedding kommt. Bei Erreichen eines Schwellenwertes zum natürlichen Toleranzverlust könnte dies eine Erklärung für das gehäufte Auftreten des Bullösen Pemphigoid im Alter sein. In diesem Zusammenhang wurde auch die Rolle von

TACE, TIMP-3 und den Plasminogenaktivatoren anhand ihrer Expression studiert. Die Proteinexpression wurde mit Western Blot -Analyse dargestellt und für die Genexpression kam RT-PCR zum Einsatz.

In dieser Arbeit konnte belegt werden, dass die Expression von Kollagen XVII in Keratinozyten nicht altersabhängig ist. Allerdings konnte gezeigt werden, dass im Alter verstärktes Shedding auftritt. Zur Absicherung dieser Daten sind Studien mit einem erhöhten Probenvolumen erstrebenswert. Die Frage, wodurch das verstärkte Shedding stattfindet konnte nicht eindeutig geklärt werden, da unsere Studien keine altersabhängigen Expressionsunterschiede der Sheddase TACE und ihres Inhibitors TIMP-3 auf RNA-Ebene aufzeigen konnten. Eventuell spielt aber die erhöhte mRNA-Expression des „urokinase-type“ -Plasminogenaktivators in Keratinozyten alter Spender, die in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, eine indirekte Rolle in der Ätiogenese vom Bullösen Pemphigoid.

Kapitel 7

Summary

Collagen XVII is the best studied member of the collagenous transmembrane proteins. This membrane bound protein, initially identified as the 180-kDa bullous pemphigoid antigen (BP180), is a surface protein of the basal keratinocytes. Its cytosolic N-terminus is located within the hemidesmosomal plaque, whereas the extracellular domain resides in the region of the anchoring filaments in the basement membrane zone. The collagen XVII molecule comprises three α -chains with a molecular mass of 180 kDa. The ectodomain contains 15 collagenous (COL1-COL15) and 16 non-collagenous sequences (NC1-NC16A). Collagen XVII is constitutively shed from the cell surface yielding a shorter and soluble form of the molecule that essentially spans the entire ectodomain. This soluble form has a molecular mass of 120 kDa. It is cleaved by membrane bound proteinases of the ADAM family, which in turn are activated by furin. The prototype sheddase is ADAM-17, or TACE, which can be inhibited by TIMP-3. The biological consequences of collagen XVII shedding are likely the contribution of the keratinocyte detachment during differentiation and migration, because cleavage of collagen XVII releases the cell from some of its binding partners and allows it to embark on other functions. But collagen XVII also plays a role as an autoantigen. In bullous pemphigoid there exist tissue-bound and circulating autoantibodies against collagen XVII, especially directed to the NC16A-domain in the ectodomain. The binding of autoantibodies together with inflammation-related processes leads to epidermal-dermal separation and skin blistering.

The aim of this study was to answer the question whether there are differences in the expression of collagen XVII in young and old volunteers. Loss of tolerance could initiate the pathogenesis of BP. Additionally, the role of the sheddase TACE and its inhibitor TIMP-3, further more the role of plasminogen activators, was examined to figure out the pathway for the initialization of bullous pemphigoid. Protein expression levels were detected by SDS-PAGE and Western blot analysis. The genomic expression was determined by RT-PCR.

It has been shown that the expression of collagen XVII is not different in keratinocytes derived from young and old donors, but the shedding of collagen XVII was significantly increased in the cells of older persons. This result needs to be confirmed by further studies with larger sample size. To explain the higher shedding rate, the mRNA expression of TACE, and TIMP-3 have been analyzed, but failed to give an explanation, since no significant differences in young and old persons have been observed. In addition, a significantly higher level of urokinase-type plasminogen activator mRNA has been found in keratinocytes of older people. This could play an indirect role in the pathogenesis of BP.

Literatur

Amour, A., P. M. Slocombe, A. Webster, M. Butler, C. G. Knight, B. J. Smith, P. E. Stephens, C. Shelley, M. Hutton, V. Knauper, A. J. Docherty and G. Murphy (1998). "TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3." FEBS Lett **435**(1): 39-44.

Areida, S. K., D. P. Reinhardt, P. K. Muller, P. P. Fietzek, J. Kowitz, M. P. Marinkovich and H. Notbohm (2001). "Properties of the collagen type XVII ectodomain. Evidence for n- to c-terminal triple helix folding." J Biol Chem **276**(2): 1594-601.

Balding, S. D., L. A. Diaz and G. J. Giudice (1997). "A recombinant form of the human BP180 ectodomain forms a collagen-like homotrimeric complex." Biochemistry **36**(29): 8821-30.

Bernard, P., L. Vaillant, B. Labeille, C. Bedane, B. Arbeille, J. P. Denoeux, G. Lorette, J. M. Bonnetblanc and C. Prost (1995). "Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. Bullous Diseases French Study Group." Arch Dermatol **131**(1): 48-52.

Black, R. A., C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March and D. P. Cerretti (1997). "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells." Nature **385**(6618): 729-33.

Boyce, S. T. and R. G. Ham (1983). "Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture." J Invest Dermatol **81**(1 Suppl): 33s-40s.

Brenner, S., J. Mashiah, E. Tamir, I. Goldberg and Y. Wohl (2003). "PEMPHIGUS: an acronym for a disease with multiple etiologies." Skinmed **2**(3): 163-7.

Bruckner-Tuderman, L., O. Nilssen, D. R. Zimmermann, M. T. Dours-Zimmermann, D. U. Kalinke, T. Gedde-Dahl, Jr. and J. O. Winberg (1995). "Immunohistochemical and mutation analyses demonstrate that procollagen VII is processed to collagen VII through removal of the NC-2 domain." J Cell Biol **131**(2): 551-9.

Delgado, J. C., D. Turbay, E. J. Yunis, J. J. Yunis, E. D. Morton, K. Bhol, R. Norman, C. A. Alper, R. A. Good and R. Ahmed (1996). "A common major histocompatibility complex class II allele HLA-DQB1* 0301 is present in clinical variants of pemphigoid." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8569-71.

Effendy, I. and M. Kerscher (2005). Haut und Alter, Thieme Verlag. 108 S. 3-13-133571-8.

Franzke, C. W., P. Bruckner and L. Bruckner-Tuderman (2005). "Collagenous transmembrane proteins: recent insights into biology and pathology." J Biol Chem **280**(6): 4005-8.

Franzke, C. W., K. Tasanen, L. Borradori, V. Huotari and L. Bruckner-Tuderman (2004). "Shedding of collagen XVII/BP180: structural motifs influence cleavage from cell surface." J Biol Chem **279**(23): 24521-9.

Franzke, C. W., K. Tasanen, H. Schumann and L. Bruckner-Tuderman (2003). "Collagenous transmembrane proteins: collagen XVII as a prototype." Matrix Biol **22**(4): 299-309.

Franzke, C. W., K. Tasanen, H. Schacke, Z. Zhou, K. Tryggvason, C. Mauch, P. Zigrino, S. Sunnarborg, D. C. Lee, F. Fahrenholz and L. Bruckner-Tuderman (2002). "Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs." Embo J **21**(19): 5026-35.

Freudiger, U., E.-G. Grünbaum and E. Schimke (1997). Klinik der Hundekrankheiten. Stuttgart, Ferdinand Enke Verlag. 2. Auflage. 1035 S. 3-432-29542-1.

Fritsch, P. (1998). Dermatologie und Venerologie, Lehrbuch und Atlas. Berlin, Springer Verlag. S. 3-54-000332-0.

Giudice, G. J., D. J. Emery and L. A. Diaz (1992). "Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180." J Invest Dermatol **99**(3): 243-50.

Haase, C., L. Budinger, L. Borradori, C. Yee, H. F. Merk, K. Yancey and M. Hertl (1998). "Detection of IgG autoantibodies in the sera of patients with bullous and gestational pemphigoid: ELISA studies utilizing a baculovirus-encoded form of bullous pemphigoid antigen 2." J Invest Dermatol **110**(3): 282-6.

Hellebrekers, B. W., T. C. Trimbos-Kemper, J. B. Trimbos, J. J. Emeis and T. Kooistra (2000). "Use of fibrinolytic agents in the prevention of postoperative adhesion formation." Fertil Steril **74**(2): 203-12.

Helling, R. B., H. M. Goodman and H. W. Boyer (1974). "Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis." J Virol **14**(5): 1235-44.

Hirako, Y., Y. Nishizawa, C. Sitaru, A. Opitz, K. Marcus, H. E. Meyer, E. Butt, K. Owaribe and D. Zillikens (2003). "The 97-kDa (LABD97) and 120-kDa (LAD-1) fragments of bullous pemphigoid antigen 180/type XVII collagen have different N-termini." J Invest Dermatol **121**(6): 1554-6.

Hirako, Y., K. Yoshino, D. Zillikens and K. Owaribe (2003). "Extracellular cleavage of bullous pemphigoid antigen 180/type XVII collagen and its involvement in hemidesmosomal disassembly." J Biochem (Tokyo) **133**(2): 197-206.

Hirako, Y., J. Usukura, J. Uematsu, T. Hashimoto, Y. Kitajima and K. Owaribe (1998). "Cleavage of BP180, a 180-kDa bullous pemphigoid antigen, yields a 120-kDa collagenous extracellular polypeptide." J Biol Chem **273**(16): 9711-7.

Hofmann, S., S. Thoma-Uszynski, T. Hunziker, P. Bernard, C. Koebnick, A. Stauber, G. Schuler, L. Borradori and M. Hertl (2002). "Severity and phenotype of bullous pemphigoid relate to autoantibody profile against the NH2- and COOH-terminal regions of the BP180 ectodomain." J Invest Dermatol **119**(5): 1065-73.

Iwasaki, T., T. Olivry, J. C. Lapiere, L. S. Chan, C. Peavey, Y. Y. Liu, J. C. Jones, P. J. Ihrke and D. T. Woodley (1995). "Canine bullous pemphigoid (BP): identification of the 180-kd canine BP antigen by circulating autoantibodies." Vet Pathol **32**(4): 387-93.

Jensen, P. J., M. John and J. Baird (1990). "Urokinase and tissue type plasminogen activators in human keratinocyte culture." Exp Cell Res **187**(1): 162-9.

Jordon, R. E., E. H. Beutner, E. Witebsky, G. Blumental, W. L. Hale and W. F. Lever (1967). "Basement zone antibodies in bullous pemphigoid." Jama **200**(9): 751-6.

Jung, M., W. Kippes, G. Messer, D. Zillikens and B. Rzany (1999). "Increased risk of bullous pemphigoid in male and very old patients: A population-based study on incidence." J Am Acad Dermatol **41**(2 Pt 1): 266-8.

Labib, R. S., G. J. Anhalt, H. P. Patel, D. F. Mutasim and L. A. Diaz (1986). "Molecular heterogeneity of the bullous pemphigoid antigens as detected by immunoblotting." J Immunol **136**(4): 1231-5.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.

Lever, W. F. (1953). "Pemphigus." Medicine (Baltimore) **32**(1): 1-123.

Li, K. H., D. Sawamura, G. J. Giudice, L. A. Diaz, M. G. Mattei, M. L. Chu and J. Uitto (1991). "Genomic organization of collagenous domains and chromosomal assignment of human 180-kDa bullous pemphigoid antigen-2, a novel collagen of stratified squamous epithelium." J Biol Chem **266**(35): 24064-9.

Liddel, E. and I. Weeks (1996). Antikörpertechniken. Heidelberg, Spektrum Akadem. Verlag.

Lijnen, H. R. (2002). "Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity." Biochemistry (Mosc) **67**(1): 92-8.

Liu, Z., N. Li, L. A. Diaz, M. Shipley, R. M. Senior and Z. Werb (2005). "Synergy between a plasminogen cascade and MMP-9 in autoimmune disease." J Clin Invest **115**(4): 879-87.

Liu, Z., L. A. Diaz, J. L. Troy, A. F. Taylor, D. J. Emery, J. A. Fairley and G. J. Giudice (1993). "A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180." J Clin Invest **92**(5): 2480-8.

Löffler, G. (1999). Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. Heidelberg, Springer-Verlag. 756 S. 3-540-64500-4.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-75.

Marinkovich, M. P., T. B. Taylor, D. R. Keene, R. E. Burgeson and J. J. Zone (1996). "LAD-1, the linear IgA bullous dermatosis autoantigen, is a novel 120-kDa anchoring filament protein synthesized by epidermal cells." J Invest Dermatol **106**(4): 734-8.

McGrath, J. A., B. Gatalica, A. M. Christiano, K. Li, K. Owaribe, J. R. McMillan, R. A. Eady and J. Uitto (1995). "Mutations in the 180-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG2), a hemidesmosomal transmembrane collagen (COL17A1), in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa." Nat Genet **11**(1): 83-6.

Mirastschijski, U., K. Johannesson, B. Jeppsson and M. S. Agren (2005). "Effect of a matrix metalloproteinase activity and TNF-alpha converting enzyme inhibitor on intra-abdominal adhesions." Eur Surg Res **37**(1): 68-75.

Mullins, D. E. and S. T. Rohrich (1983). "The role of proteinases in cellular invasiveness." Biochim Biophys Acta **695**(3-4): 177-214.

Nanda, A., K. Al-Saeid, H. Al-Sabah, R. Dvorak and Q. A. Alsaleh (2006). "Clinicoepidemiological features and course of 43 cases of bullous pemphigoid in Kuwait." Clin Exp Dermatol **31**(3): 339-42.

Nanda, A., R. Dvorak, K. Al-Saeed, H. Al-Sabah and Q. A. Alsaleh (2004). "Spectrum of autoimmune bullous diseases in Kuwait." Int J Dermatol **43**(12): 876-81.

Niemand, H. G. and P. F. Suter (2001). Praktikum der Hundeklinik. Berlin, Parey Buchverlag im Blackwell Wissenschafts-Verlag GmbH. 9.Auflage. 1346 S. 3-8263-3154-0.

Olivry, T., A. K. Borrillo, L. Xu, S. M. Dunston, N. M. Slovis, V. K. Affolter, T. C. Demanuelle and L. S. Chan (2000). "Equine bullous pemphigoid IgG autoantibodies target linear epitopes in the NC16A ectodomain of collagen XVII (BP180, BPAG2)." Vet Immunol Immunopathol **73**(1): 45-52.

Olivry, T., M. L. Mirsky, W. Singleton, S. M. Dunston, A. K. Borrillo, L. Xu, T. Traczyk, D. L. Rosolia and L. S. Chan (2000). "A spontaneously arising porcine model of bullous pemphigoid." Arch Dermatol Res **292**(1): 37-45.

Olivry, T., L. S. Chan, L. Xu, P. Chace, S. M. Dunston, M. Fahey and M. P. Marinkovich (1999). "Novel feline autoimmune blistering disease resembling bullous pemphigoid in humans: IgG autoantibodies target the NC16A ectodomain of type XVII collagen (BP180/BPAG2)." Vet Pathol **36**(4): 328-35.

Powell, A. M., Y. Sakuma-Oyama, N. Oyama and M. M. Black (2005). "Collagen XVII/BP180: a collagenous transmembrane protein and component of the dermoepidermal anchoring complex." Clin Exp Dermatol **30**(6): 682-7.

Prockop, D. J. and K. I. Kivirikko (1995). "Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy." Annu Rev Biochem **64**: 403-34.

Rassner, G. (1997). Dermatologie, Lehrbuch und Atlas. München, Urban & Fischer. 480 S. 3-541-08375-1.

Robbins, K. C., L. Summaria, B. Hsieh and R. J. Shah (1967). "The peptide chains of human plasmin. Mechanism of activation of human plasminogen to plasmin." J Biol Chem **242**(10): 2333-42.

Ruocco, V. and G. Sacerdoti (1991). "Pemphigus and bullous pemphigoid due to drugs." Int J Dermatol **30**(5): 307-12.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.

Schacke, H., H. Schumann, N. Hammami-Hauasli, M. Raghunath and L. Bruckner-Tuderman (1998). "Two forms of collagen XVII in keratinocytes. A full-length transmembrane protein and a soluble ectodomain." J Biol Chem **273**(40): 25937-43.

Schmidt, E., B. Wehr, E. M. Tabengwa, S. Reimer, E. B. Brocker and D. Zillikens (2004). "Elevated expression and release of tissue-type, but not urokinase-type, plasminogen activator after binding of autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 in cultured human keratinocytes." Clin Exp Immunol **135**(3): 497-504.

Schmidt, E., E. B. Brocker and D. Zillikens (2000). Neue Aspekte zur Pathogenese des bullösen Pemphigoids. Der Hautarzt 9-2000, Springer-Verlag: 637-645.

Schumann, H., J. Baetge, K. Tasanen, F. Wojnarowska, H. Schacke, D. Zillikens and L. Bruckner-Tuderman (2000). "The shed ectodomain of collagen XVII/BP180 is targeted by autoantibodies in different blistering skin diseases." Am J Pathol **156**(2): 685-95.

Scott, D. W., W. H. Miller and C. E. Griffin (2000). Muller & Kirk's small animal dermatology. Philadelphia, Saunders Company. 1528 S. 0-7216-7618-9.

Scott, D. W. (1987). "Pemphigoid in domestic animals." Clin Dermatol **5**(1): 155-62.

Stanley, J. R., P. Hawley-Nelson, S. H. Yuspa, E. M. Shevach and S. I. Katz (1981). "Characterization of bullous pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia." Cell **24**(3): 897-903.

Stryer, L., J. Berg and J. Tymoczko (2003). Biochemie. Heidelberg, Spektrum Akadem. Verlag. 5.Auflage. 1153 S. 3-8274-1303-6.

Suzuki, M., S. Harada, K. Kanazawa, Y. Kitajima and H. Yaoita (1994). "Relationship between antigens and IgG subclasses in bullous pemphigoid." Autoimmunity **18**(3): 217-25.

Taylor, J. M., R. Illmensee and J. Summers (1976). "Efficient transcription of RNA into DNA by avian sarcoma virus polymerase." Biochim Biophys Acta **442**(3): 324-30.

Thoma-Uszynski, S., W. Uter, S. Schwietzke, S. C. Hofmann, T. Hunziker, P. Bernard, R. Treudler, C. C. Zouboulis, G. Schuler, L. Borradori and M. Hertl (2004). "BP230- and BP180-specific auto-antibodies in bullous pemphigoid." J Invest Dermatol **122**(6): 1413-22.

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.

Wiesner, E. and R. Ribbeck (2000). Lexikon der Veterinärmedizin. Stuttgart, Enke im Hippokrates Verlag GmbH. 1630 S. 3-7773-1459-5.

Zillikens, D. (2002). "BP180 as the common autoantigen in blistering diseases with different clinical phenotypes." Keio J Med **51**(1): 21-8.

Zillikens, D. and G. J. Giudice (1999). "BP180/type XVII collagen: its role in acquired and inherited disorders of the dermal-epidermal junction." Arch Dermatol Res **291**(4): 187-94.

Zillikens, D., K. Herzele, M. Georgi, E. Schmidt, I. Chimanovitch, H. Schumann, J. M. Mascaro, Jr., L. A. Diaz, L. Bruckner-Tuderman, E. B. Brocker and G. J. Giudice (1999). "Autoantibodies in a subgroup of patients with linear IgA disease react with the NC16A domain of BP180." J Invest Dermatol **113**(6): 947-53.

Zillikens, D., P. A. Rose, S. D. Balding, Z. Liu, M. Olague-Marchan, L. A. Diaz and G. J. Giudice (1997). "Tight clustering of extracellular BP180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies." J Invest Dermatol **109**(4): 573-9.

Zillikens, D., S. Wever, A. Roth, B. Weidenthaler-Barth, T. Hashimoto and E. B. Brocker (1995). "Incidence of autoimmune subepidermal blistering dermatoses in a region of central Germany." Arch Dermatol **131**(8): 957-8.

Zone, J. J., T. B. Taylor, L. J. Meyer and M. J. Petersen (1998). "The 97 kDa linear IgA bullous disease antigen is identical to a portion of the extracellular domain of the 180 kDa bullous pemphigoid antigen, BPAg2." J Invest Dermatol **110**(3): 207-10.

Zone, J. J., T. B. Taylor, D. P. Kadunce, T. P. Chorzelski, L. A. Schachner, J. C. Huff, L. J. Meyer and M. J. Petersen (1996). "IgA antibodies in chronic bullous disease of childhood react with 97 kDa basement membrane zone protein." J Invest Dermatol **106**(6): 1277-80.

Zone, J. J., T. B. Taylor, D. P. Kadunce and L. J. Meyer (1990). "Identification of the cutaneous basement membrane zone antigen and isolation of antibody in linear immunoglobulin A bullous dermatosis." J Clin Invest **85**(3): 812-20.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der beiden Formen des humanen BP180-Proteins	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Shedding-Vorgangs.	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung der proteolytischen Kaskade bei der Fibrinolyse	12
Abbildung 4: Western Blot -Analyse von Zell-Extrakten und konzentrierten Zellkulturmedien aus humanen primären Keratinozyten	36
Abbildung 5: Vergleich der Kollagen XVII -Expression in humanen Keratinozyten von jungen und alten Probanden.....	37
Abbildung 6: Nachweis der Kollagen XVII-Ektodomäne im Zellkulturmedium.....	39
Abbildung 7: Vergleich des Ektodomänen-Sheddings von Keratinozyten alter Männer zu Keratinozyten alter Frauen	40
Abbildung 8: Repräsentatives Bild eines Agarosegels mit den spezifischen DNA-Amplifikaten.....	41
Abbildung 9: Repräsentatives Agarosegel der Amplifikate für die Plasminogenaktivatoren.	43
Abbildung 10: Nachweis der uPA -Expression.	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: SDS-PAGE Proteinstandards	19
Tabelle 2: Pipettierschema für Minigele (Biometra)	27
Tabelle 3: Pipettierschema für die RT-PCR	32
Tabelle 4 : Auflistung der Primer	33
Tabelle 5: Nachweis der Vollform des Kollagen XVII.	37
Tabelle 6: Nachweis der Kollagen XVII -Ektodomäne im Medium.	39
Tabelle 7: Relative Expression von Kollagen XVII, TACE und TIMP-3	42
Tabelle 8: Nachweis der tPA- und uPA-Expression.	43

Abkürzungsverzeichnis

AA	Antibiotika-Antimykotika (10000 U/ml Penicillin G, 10000 µg/ml Streptomycin, 25 µg/ml Amphotericin B)
Abb.	Abbildung
ADAM	<u>A</u> <u>d</u> isintegrin <u>a</u> nd <u>m</u> etalloproteinase
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-toluidinsalz
bp	Basenpaare
<i>BP</i>	<i>Bullöses Pemphigoid</i>
<i>BPAG</i>	<i>Bullöses Pemphigoid Antigen</i>
<i>BP180</i>	<i>andere Bezeichnung für Kollagen XVII</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BSB	Blue Sample Buffer
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary/ komplementäre DNA
DMEM	Dulbecco`s modification of eagle`s medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid Triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediamine-tetraaceticacid
EGF	Epidermal Growth Factor
FCS	Fötales Kälberserum
g	Erdanziehung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure

Ig	Immunglobulin
IOD	integrierte Optische Dichte
kDa	Kilodalton
M	Molar
mA	Milliamper
Median	mittelster Wert der der Größe nach geordneten Meßreihe
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger -RNA
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchloride
NHK	Normale Humane Keratinozyten
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pefabloc SC	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-hydrochlorid
R	engl.:range, Variationsbreite (Differenz aus größtem und kleinstem Messwert)
rEGF	rekombinanter epidermaler Wachstumsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung vom Mittelwert
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Sodium dodecyl sulfat
SFM	serumfreies Keratinocyten-Basalmedium
Shedding	hier: Abgabe der Ektodomäne von Kollagen XVII
TACE	TNF- α -Converting Enzyme
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
tPA	Tissue-type Plasminogenaktivator
Tris	Tris-(hydroxymethyl)methylamine
U	engl.: Units/ Einheiten
uPA	Urokinase-type Plasminogenaktivator
Upm	Umdrehungen pro Minute

UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteil
w/v	Gewichtsanteil

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Reto Neiger danken, der es mir überhaupt erst ermöglichte eine tiermedizinische externe Doktorarbeit anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. Michael Hertl danke ich herzlich für die freundliche Betreuung und seine Unterstützung, diese Doktorarbeit zu realisieren.

Frau Prof. Dr. Leena Bruckner-Tuderman danke ich besonders, dass ich in ihrem sehr gut ausgestatteten Labor meine Doktorarbeit durchführen durfte.

Ein herzliches Dankeschön gilt Herrn Dr. Claus-Werner Franzke für seine engagierte Betreuung und für das immer freundliche Forcieren zur Fertigstellung der Doktorarbeit. Seine stetige Diskussionsbereitschaft und seine vielen guten Ratschläge waren mir insbesondere in schwierigen Zeiten eine große Hilfe und Ermutigung.

Danke an die Institutsangehörigen, ohne deren Hilfe arbeitstechnische Probleme nicht so einfach hätten bewältigt werden können.

Dankeschön auch Frau Dr. Petra Mühlenhardt für ihre Hilfsbereitschaft und das unermüdlichen Einbringen ihrer PC-Kenntnisse.

Nicht zuletzt ein besonderer Dank an meine Mutter für die immerwährende mentale und finanzielle Unterstützung in allen Phasen meines Lebens und an meinen Partner Dietmar Gebhard für seine Liebe und die seelische Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name Sonja Huttenlocher
 Eltern Dipl.-Ing. Werner Huttenlocher und Margret Huttenlocher,
 geb. Weber
 Geboren am 06.12.1976 in Leonberg

Schule:

1983-1987 Grundschule Calw-Stammheim
 1987-1996 Hermann-Hesse-Gymnasium Calw-Stammheim
 1996 Abitur in Calw-Stammheim

Ausbildung:

1996-1998 Ausbildung zur Bankkauffrau mit Zusatz Allfinanz,
 Deutsche Bank AG, Stuttgart

Studium:

1999-2005 Studium der Tiermedizin, 1.Semester an der Universität Leipzig,
 ab dem 2.Semester Justus-Liebig-Universität Gießen
 Jan 2005 Approbation als Tierärztin

Tätigkeiten:

1998-1999 Aushilfstätigkeit bei Daimler Chrysler, Sindelfingen
 März-Dez 2005 Assistenzärztin in der Kleintierklinik Frank, Freiburg
 Seit Mai 2006 Assistenzärztin in der Kleintierklinik in der Wiehre, Freiburg

Promotion:

Seit Jan 2006 Experimentelle Arbeit zur vorliegenden Dissertation im Labor
 der Hautklinik des Universitätsklinikums Freiburg
 Thema:
 Untersuchung altersbedingter Veränderungen von Kollagen XVII

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5161-0



9 783835 951617 ⑦